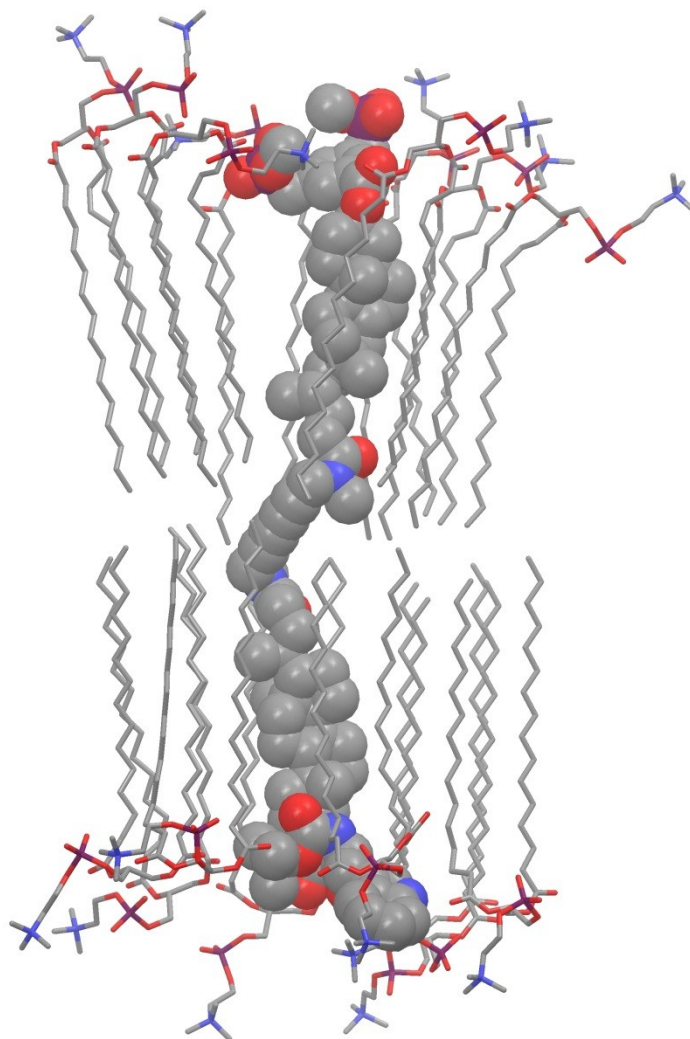

**Von schaltbaren FRET-Rezeptoren
in Lipiddoppelschichten
zur echten künstlichen
Signaltransduktion**



Doktorarbeit

Kai Bernitzki

2011

**Von schaltbaren FRET-Rezeptoren
in Lipiddoppelschichten
zur echten künstlichen
Signaltransduktion**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

(Dr. rer. Nat.)

in der Fakultät Chemie
der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Kai Max Bernitzki

aus Nordhorn

Essen 2011

**Von schaltbaren FRET-Rezeptoren
in Lipiddoppelschichten
zur echten künstlichen
Signaltransduktion**

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Schrader
Prof. Dr. Gebhard Haberhauer
Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. Hans-Curt Flemming
Tag der Disputation: 01.12.2011

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Schrader in der Zeit von Oktober 2007 bis April 2011 am Fachbereich Chemie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

Ich erkläre hiermit des Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbst verfasst und mich dabei keiner anderen als der von mir bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Ich erkläre hiermit, dass ich an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt, beziehungsweise die Dissertation in dieser oder anderer Form bereits anderwertig als Prüfungsarbeit verwendet oder einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt habe.

Essen, im Juni 2011

.....

Kai Bernitzki

Teile dieser Arbeit sind publiziert, eingereicht oder auf Kongressen präsentiert worden:

- [1] Poster: Supracat Conference 2008: 02. – 05. March, Barcelona - K. Bernitzki, T. Schrader, „Entirely Artificial Signaltransduction with Adrenaline“, Barcelona, **2008**.
- [2] M. Maue, K. Bernitzki, M. Ellermann, T. Schrader, „Bifunctional Bisamphiphilic Transmembrane Building Blocks for Artificial Signal Transduction“, *Synthesis* **2008**, 14, 2247-2256.
- [3] K. Bernitzki, T. Schrader, „Entirely Artificial Signal Transduction with a Primary Messenger“, *Angew. Chem.* **2009**, 121, 8145-8149.
- [4] K. Bernitzki, „Künstliche Signaltransduktion mit einem primären Botenstoff“, Vortrag im Rahmen des Neujahrskolloquium 2010, Essen, **2010**.
- [5] T. Schrader, „Entirely Artificial Signal Transduction with a Primary Messenger“, Vortrag im Rahmen der ORCHEM 2010: 13. – 15. September, Weimar, **2010**.
- [6] Poster: Symposium in Supramolecular Chemistry 2011: 24. – 25. February, Essen –K. Bernitzki, T. Schrader, „Entirely Artificial Signal Transduction with a Primary Messenger“, Essen, **2011**.
- [7] K. Bernitzki, M. Maue, T. Schrader, „Imitating Nature: Artificial Signal Transduction with Primary and Secondary Messenger“, submitted to *J. Am. Chem. Soc.*

Danksagung

Ich möchte mich bei einigen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Prof. Dr. Thomas Schrader möchte ich für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis und die herausfordernde und überaus interessante Themenstellung danken. Seine freundliche Betreuung und die Möglichkeit, mich stets frei auf dem mir vorgegebenen Forschungsgebiet zu bewegen, haben mich immer wieder motiviert und mir bei der Anfertigung dieser Arbeit sehr geholfen.

Herrn Prof. Dr. Gebhard Haberhauer danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Prof. Dr. H. C. Flemming danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Ein ganz besonderer Dank gilt Eva Ziegler und Markus Schnopp für die gute Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft bei Fragen und Problemen. Die tolle Atmosphäre - nicht nur im Labor, sondern auch bei unseren zahlreichen Treffen und Unternehmungen - hat wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Des Weiteren gilt ein besonderer Dank Jolanta Polkowska und Klaus Kowski für die stets gute Atmosphäre im und außerhalb des Labors, die Hilfsbereitschaft bei Fragen und Problemen und die vielseitige und kompetente Hilfe bei Problemen jeglicher Art.

Bei meinen Vertiefungs- und Bachelorstudenten Lina Bartsch, Martin Ehlers und Marco Hellmert, sowie meinen Auszubildenden Nadine Trumbach und Kevin Bajoran möchte ich mich für die tatkräftige Unterstützung und die erfolgreiche Arbeit im Labor bedanken. Nadine und Kevin haben mit Ihrer motivierenden, selbstständigen und immer überaus ordentlichen Arbeitsweise weite Teile dieser Arbeit erst ermöglicht. So viele Säulen hätte ein einzelner im Labor in drei Jahren niemals bewältigen können. Was hätte ich nur ohne Euch gemacht?!

Für die kritische Durchsicht meiner Arbeit möchte ich mich bei Eva Ziegler, Jolanta Polkowska bedanken.

Bei den Mitgliedern der Arbeitskreise Schrader und Haberhauer möchte ich mich für die anregende und lebhafte Arbeitsatmosphäre, zahlreiche Hilfestellungen und Ideen, sowie für Treffen und Unternehmungen bedanken.

Für die besonderen Bemühungen zur Aufnahme von NMR-Spektren, sowie zahlreichen Hilfestellungen, möchte ich mich bei Heinz Bandmann und Torsten Schaller bedanken. Dank gebührt ebenfalls Werner Karow und Winfried van Hoof, sowie dem gesamten Team der Massenspektrometrischen Abteilung für die Aufnahme und Bearbeitung zahlreicher Massenspektren.

Allen Freunden, besonders Oliver Thomas, Andreas Pfanzer und Tobias Riemann sei für die Begleitung in den nunmehr letzten 10 Jahren gedankt. Ohne Euch wäre ich jetzt wohl nicht in der Situation, diese Danksagung zu verfassen.

Auch wenn ohne direkten Bezug zu dieser Arbeit, sei Michael Maue, Gerhard Schäfer und Matthias Junkers gedankt, denn ohne Sie wäre diese Arbeit so wohl nicht entstanden.

Bei meinen Eltern und Großeltern möchte ich mich für Ihre Hilfsbereitschaft und die ständige bedingungslose Unterstützung bei allen Problemen, Höhen und Tiefen der letzten Jahre bedanken. Ohne Eure großartige Unterstützung und Euren Rückhalt wäre ich erst gar nicht in die Situation gekommen, eine solche Arbeit verfassen zu können.

Danke!

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG.....	- 1 -
1.1 Biochemische Kommunikation und Neurotransmitter.....	- 2 -
1.2 Aufbau von Liposomen und Biomembranen	- 8 -
1.3 Membranproteine und natürliche Signaltransduktion.....	- 20 -
1.4 β -adrenerge Rezeptoren	- 26 -
1.5 Rezeptor-Tyrosinkinasen.....	- 29 -
1.6 Künstliche Signaltransduktionssysteme	- 32 -
 2 AUFGABENSTELLUNG	- 55 -
 3 DURCHFÜHRUNG UND ERGEBNISSE	- 61 -
3.1 Moleküldesign und Retrosynthese.....	- 61 -
3.2 Synthese der Rezeptoren 66 und 67	- 66 -
3.2.1 Synthese des Gerüstbausteins 65.....	- 66 -
3.2.2 Synthese des Rezeptors 83 mit Tryptophan-Donoreinheit	- 72 -
3.3.3 Synthese des Rezeptors 67 mit Dansyl-Akzeptoreinheit	- 76 -
3.3 Signaltransduktionsexperimente mit den Rezeptoren 83 und 67	- 78 -
3.3.1 Fluoreszenzspektroskopie.....	- 78 -
3.2.2 Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)	- 80 -
3.3.3 Einlagerung der Rezeptoren 83 und 67 in DPPC-Liposomen.....	- 84 -
Vorbereitende Messungen	- 84 -
Liposomenpräparation	- 86 -
Fluoreszenzmessungen und Signaltransduktion	- 87 -
3.3.4 Auswertung und Interpretation der Ergebnisse	- 97 -
3.4 Optimierung und genauere Charakterisierung des Signaltransduktion	- 103 -
3.4.1 Synthese des Rezeptors 66 mit modifizierter Donor-Einheit	- 105 -
3.4.2 Signaltransduktionsexperimente mit 66 und 67 in DPPC-Liposomen	- 108 -
3.4.3 Signaltransduktionsexperimente mit 66 und 67 bei erhöhter Temperatur	- 111 -
3.4.4 Variation der Membrandotierung.....	- 113 -
3.4.5 Verwendung von DMPC als Liposomenmaterial.....	- 115 -
3.4.6 Verwendung von DMPC/DPPC-Gemischen als Liposomenmaterial.....	- 117 -
Bestimmung der Phasenübergangstemperaturen	- 125 -
Bestimmung der Phasenübergangstemperaturen dotierter DMPC/DPPC-Liposomen.....	- 131 -

Synthese der Transmembranbausteine 88 und 90	- 132 -
Synthese der Membranbausteine 93, 94, 97, 99 mit Arginin-Kopfgruppe	- 134 -
Einlagerung monomerer Lithocholsäurederivate	- 137 -
Einlagerung dimerer Lithocholsäurederivate	- 140 -
3.4.7 Ausschluss der Membranpermeabilität von DPPC-Liposomen für den Botenstoff DET	- 144 -
3.4.8 Bestimmung der Einlagerungsgeometrie.....	- 147 -
Synthese des heterodimeren Transmembranbausteins 85	- 151 -
Synthese des heterodimeren Transmembranbausteins 110	- 161 -
Experimente mit dem unsymmetrischen Transmembranbaustein 110	- 163 -
Experimente mit den Rezeptoren 66 und 67 und Eosin Y 112 als Fluoreszenzsonde	- 167 -
Experimente mit extrazellulär zugesetztem Eosin Y 112 und den Rezeptoren 66 und 67	- 172 -
Experimente mit inkludiertem Eosin Y 112 und den Rezeptoren 66 und 67	- 175 -
3.4.9 Ausschluss eines interzellulären Energie-Transfers	- 178 -
3.4.10 Untersuchung des permanenten Energie-Transfers	- 179 -
3.4.11 Bestimmung der FRET-Effizienz des Systems 66 und 67 in DMPC/DPPC	- 187 -
3.4.12 Bestimmung der notwendigen Botenstoffkonzentration.....	- 191 -
3.4.13 Verwendung anderer Botenstoffe	- 192 -
3.5 Signaltransduktionsexperimente mit den Rezeptoren 67 und 121	- 195 -
3.5.1 Synthese des Rezeptors 121 mit Quencher-Einheit	- 196 -
3.5.2 Signaltransduktionsexperimente mit den Rezeptoren 67 und 121	- 197 -
3.6 Signaltransduktionsexperimente mit dem Rezeptor 123	- 201 -
3.6.1 Synthese des Rezeptors 123 mit Pyreneinheit	- 203 -
3.6.2 Signaltransduktionsexperimente mit dem Rezeptor 123	- 209 -
3.7 Signaltransduktionsexperimente mit den Rezeptoren 138 und 139	- 213 -
3.7.1 Synthese der Rezeptoren 138 und 139	- 214 -
3.7.2 Signaltransduktionsexperimente mit den Rezeptoren 138 und 139	- 219 -
3.7.3 Ausschluss einer interzellulären Reaktion der Rezeptoren 138 und 139	- 227 -
3.7.4 Verwendung anderer Lipidmischungen.....	- 228 -
3.7.5 Verwendung anderer Botenstoffe	- 231 -
3.8 Synthese einer neuen Generation von Transmembranrezeptoren	- 234 -
3.8.1 Synthese der Modellverbindung 172 mit photolabiler <i>o</i> -Nitrobenzyl-Schutzgruppe	- 240 -
3.8.2 Vorexperimente mit der Modellverbindung 172	- 241 -
3.8.3 Synthese des halben Transmembransegments 173 mit photolabiler Schutzgruppe.....	- 243 -
3.8.4 Vorexperimente mit dem halben Membransegment 173 in DMPC/DPPC-Liposomen	- 244 -
3.8.5 Synthese des Rezeptors 174 mit photolabiler <i>o</i> -Nitrobenzyl-Schutzgruppe	- 245 -
3.8.6 Synthese des Carboxy-BIPM-Fluorophors 170	- 248 -

3.8.7 Experimente mit dem Carboxymethylester-BIPM-Fluorophor 171 und Ac-Cys-OH.....	- 251 -
4 ZUSAMMENFASSUNG.....	- 253 -
5 EXPERIMENTELLER TEIL	- 265 -
5.1 Materialien	- 265 -
5.2 Methoden.....	- 268 -
5.3 Synthesen	- 271 -
5.3.1 Synthese der transmembranen Gerüstbausteine	- 271 -
Lithocholsäure- <i>N</i> -methylpropargylamid (71).....	- 271 -
<i>N</i> -Boc-glycin-lithocholsäure- <i>N</i> -methylpropargylamid 72	- 277 -
Trifluoracetat-glycin-lithocholsäure- <i>N</i> -methylpropargylamid 73	- 280 -
<i>N</i> -Acetyl-cystein-(<i>S</i> -trityl)-lithocholsäure- <i>N</i> -methylpropargylamid 140	- 283 -
BP-lithocholsäure- <i>N</i> -methylpropargylamid 75	- 286 -
BP(OLi) ₂ -lithocholsäure- <i>N</i> -methylpropargylamid 76	- 289 -
BP-(lithocholsäure- <i>N</i> -methylpropargylamid-Dimer)-OH 189	- 292 -
<i>N</i> -Boc-glycin-(lithocholsäure- <i>N</i> -methylpropargylamid-Dimer)-BP 77	- 295 -
<i>N</i> -Boc-glycin-(lithocholsäure- <i>N</i> -methylpropargylamid-Dimer)-BP(OLi) ₂ 78	- 298 -
Trifluoracetat-glycin-(lithocholsäure- <i>N</i> -methylpropargylamid-Dimer)-BP 65	- 301 -
<i>N</i> -Acetyl-cystein-(<i>S</i> -trityl)-(lithocholsäure- <i>N</i> -methylpropargylamid-Dimer)-BP 143	- 304 -
<i>N</i> -Fmoc-glycin-lithocholsäure- <i>N</i> -methylpropargylamid 103	- 307 -
Glycin-lithocholsäure- <i>N</i> -methylpropargylamid 105	- 310 -
TMSO-lithocholsäure- <i>N</i> -methylpropargylamid 136	- 313 -
HO-lithocholsäure- <i>N</i> -methylpropargylamid (71)	- 316 -
<i>N</i> -Boc-arginin(Boc) ₂ -lithocholsäure- <i>N</i> -methylpropargylamid 91	- 319 -
Trifluoracetat-arginin-lithocholsäure- <i>N</i> -methylpropargylamid 93	- 322 -
<i>N</i> -Boc-arginin(Boc) ₂ - <i>N</i> -glycin-lithocholsäure- <i>N</i> -methylpropargylamid 92	- 325 -
Trifluoracetat-arginin- <i>N</i> -glycin-lithocholsäure- <i>N</i> -methylpropargylamid 94	- 328 -
<i>N</i> -Fmoc-glycin-(lithocholsäure- <i>N</i> -methylpropargylamid-Dimer)-OH 190	- 331 -
<i>N</i> -Fmoc-glycin-(lithocholsäure- <i>N</i> -methylpropargylamid-Dimer)-OTMS 191	- 334 -
5.3.2 Synthese der Rezeptoren 66 und 83 mit Tryptophan-Donor-Einheit.....	- 337 -
<i>N</i> -Boc-tryptophan- <i>N</i> -glycin-lithocholsäure- <i>N</i> -methylpropargylamid 86	- 337 -
<i>N</i> -Boc-tryptophan- <i>N</i> -glycin-(lithocholsäure- <i>N</i> -methylpropargylamid-Dimer)-BP 80	- 340 -
<i>N</i> -Boc-tryptophan- <i>N</i> -glycin-(lithocholsäure- <i>N</i> -methylpropargylamid-Dimer)-BP(OLi) ₂ 66 -	343 -
<i>N</i> -Boc-tryptophan(Boc)- <i>N</i> -glycin-lithocholsäure- <i>N</i> -methylpropargylamid 192	- 346 -
<i>N</i> -Boc-tryptophan(Boc)- <i>N</i> -glycin-(lithocholsäure- <i>N</i> -methylpropargylamid-Dimer)-BP 81 -	349 -

<i>N</i> -Boc-tryptophan(Boc)- <i>N</i> -glycin-(lithocholsäure- <i>N</i> -methylpropargylamid-Dimer)-BP(OLi) ₂ 83	- 352 -
5.3.3 Synthese des Rezeptors 67 mit Dansyl-Akzeptor-Einheit	- 355 -
<i>N</i> -Dansyl-glycin-lithocholsäure- <i>N</i> -methylpropargylamid 100	- 355 -
<i>N</i> -Dansyl-glycin-(lithocholsäure- <i>N</i> -methylpropargylamid-Dimer)-BP 84	- 358 -
<i>N</i> -Dansyl-glycin-(lithocholsäure- <i>N</i> -methylpropargylamid-Dimer)-BP(OLi) ₂ 67	- 361 -
5.3.4 Synthese des Rezeptors 121 mit Dabcyl-Quencher-Einheit	- 364 -
<i>N</i> -Dabcyl-glycin-OMe (193)	- 364 -
<i>N</i> -Dabcyl-glycin-lithocholsäure- <i>N</i> -methylpropargylamid 111	- 367 -
<i>N</i> -Dabcyl-glycin-(lithocholsäure- <i>N</i> -methylpropargylamid-Dimer)-BP 122	- 370 -
<i>N</i> -Dabcyl-glycin-(lithocholsäure- <i>N</i> -methylpropargylamid-Dimer)-BP(OLi) ₂ 121	- 373 -
5.3.5 Synthese des Rezeptors 123 mit Pyren-Einheit	- 376 -
<i>N</i> -(1-Pyrenessigsäure)-glycin-lithocholsäure- <i>N</i> -methylpropargylamid 130	- 376 -
<i>N</i> -(1-Pyrenessigsäure)-glycin-(lithocholsäure- <i>N</i> -methylpropargylamid-Dimer)-BP 137	- 379 -
<i>N</i> -(1-Pyrenessigsäure)-glycin-(lithocholsäure- <i>N</i> -methylpropargylamid-Dimer)-BP(OLi) ₂ 123	- 382 -
5.3.6 Synthese der symmetrischen Transmembranbausteine	- 385 -
(Lithocholsäure- <i>N</i> -methylpropargylamid)-Dimer 95	- 385 -
(<i>N</i> -Boc-glycin-lithocholsäure- <i>N</i> -methylpropargylamid)-Dimer 87	- 388 -
(Trifluoracetat-glycin-lithocholsäure- <i>N</i> -methylpropargylamid)-Dimer 88	- 391 -
(<i>N</i> -Fmoc-glycin-lithocholsäure- <i>N</i> -methylpropargylamid)-Dimer 194	- 394 -
(<i>N</i> -Boc-tryptophan- <i>N</i> -glycin-lithocholsäure- <i>N</i> -methylpropargylamid)-Dimer 195	- 397 -
(<i>N</i> -Dansyl-glycin-lithocholsäure- <i>N</i> -methylpropargylamid)-Dimer 196	- 400 -
(BP-lithocholsäure- <i>N</i> -methylpropargylamid)-Dimer 89	- 403 -
(BP(OLi) ₂ -lithocholsäure- <i>N</i> -methylpropargylamid)-Dimer 90	- 406 -
(<i>N</i> -Boc-arginin(Boc) ₂ -lithocholsäure- <i>N</i> -methylpropargylamid)-Dimer 96	- 409 -
Trifluoracetat-arginin-lithocholsäure- <i>N</i> -methylpropargylamid)-Dimer 97	- 412 -
(<i>N</i> -Boc-arginin(Boc) ₂ - <i>N</i> -glycin-lithocholsäure- <i>N</i> -methylpropargylamid)-Dimer 98	- 415 -
(Trifluoracetat-arginin- <i>N</i> -glycin-lithocholsäure- <i>N</i> -methylpropargylamid)-Dimer 99	- 418 -
(<i>N</i> -Acetyl-cystein-(<i>S</i> -trityl)-lithocholsäure- <i>N</i> -methylpropargylamid)-Dimer 197	- 421 -
5.3.7 Synthese der unsymmetrischen Transmembranbausteine	- 424 -
<i>N</i> -Fmoc-(glycin-lithocholsäure- <i>N</i> -methylpropargylamid-Dimer)- <i>N</i> -Boc 104	- 424 -
<i>N</i> -Fmoc-(glycin-lithocholsäure- <i>N</i> -methylpropargylamid-Dimer)-trifluoracetat 105	- 426 -
<i>N</i> -Fmoc-(glycin-lithocholsäure- <i>N</i> -methylpropargylamid-Dimer)-tryptophan- <i>N</i> -Boc 106 ..	- 427 -
<i>N</i> -Boc-tryptophan-(glycin-lithocholsäure- <i>N</i> -methylpropargylamid-Dimer)-NH ₂ 107	- 429 -
<i>N</i> -Dansyl-(glycin-lithocholsäure- <i>N</i> -methylpropargylamid-Dimer)- <i>N</i> -Boc 101	- 430 -
<i>N</i> -Dansyl-(glycin-lithocholsäure- <i>N</i> -methylpropargylamid-Dimer)-trifluoracetat 102	- 433 -
<i>N</i> -Dabcyl-(glycin-lithocholsäure- <i>N</i> -methylpropargylamid-Dimer)- <i>N</i> '-Dansyl 110	- 436 -

5.3.8	Synthese des Rezeptors 138 mit Thiol-Funktion	- 439 -
	<i>N</i> -Acetyl-cystein-lithocholsäure- <i>N</i> -methylpropargylamid 141	- 439 -
	<i>N</i> -Acetyl-cystein-(lithocholsäure- <i>N</i> -methylpropargylamid-Dimer)-BP 144	- 442 -
	<i>N</i> -Acetyl-cystein-(lithocholsäure- <i>N</i> -methylpropargylamid-Dimer)-BP(OLi) ₂ 138	- 445 -
5.3.9	Synthese des Rezeptors 139 mit Disulfid-Funktion	- 448 -
	<i>N</i> -Acetyl-cystein-(<i>S</i> -trityl)-(lithocholsäure- <i>N</i> -methylpropargylamid-Dimer)-BP(OLi) ₂ 145	- 448 -
	<i>N</i> -Acetyl-cystein-(<i>S</i> - <i>S</i> -pyridin)-(lithocholsäure- <i>N</i> -methylpropargylamid-Dimer)-BP(OLi) ₂ 139	- 451 -
5.3.10	Synthese des Rezeptors 174 mit photolabiler <i>o</i> -Nitrobenzyl-Schutzgruppe	- 454 -
	<i>N</i> -Acetyl-cystein-(<i>S</i> -trityl)- <i>N</i> -glycinmethylester 176	- 454 -
	<i>N</i> -Acetyl-cystein-(<i>S</i> - <i>o</i> -nitrobenzyl)- <i>N</i> -glycinmethylester 172	- 457 -
	<i>N</i> -Acetyl-cystein-(<i>S</i> - <i>o</i> -nitrobenzyl)-lithocholsäure- <i>N</i> -methylpropargylamid 173	- 460 -
5.3.11	Synthese des Rezeptors 175 mit BIPM-Fluorophor	- 463 -
	Methyl 2-(3,4-bis(<i>tert</i> -butoxycarbonylamino)benzamido)acetat 184	- 463 -
	4-(2-methoxy-2-oxoethylcarbonyl)benzol-1,2-diaminium trifluoracetat 186	- 466 -
	Methyl 2-(3,4-bis(<i>tert</i> -butoxycarbonylamino)benzamido)essigsäure 185	- 468 -
	Methyl 2-(4-acetamidophenyl)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-5-carboxylat 167	- 470 -
	2-(4-aminophenyl)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-5-carbonsäure 181	- 473 -
	Methyl 2-(4-(2,5-dioxo-2 <i>H</i> -pyrrol-1-(5 <i>H</i>)-yl)-phenyl)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-5-carboxylat 171	- 475 -
5.4	Signaltransduktionsexperimente mit den Rezeptoren 66/83 und 67	- 478 -
5.4.1	Signaltransduktionsexperimente mit DPPC-Liposomen	- 484 -
5.4.2	Signaltransduktionsexperimente mit DMPC-Liposomen	- 503 -
5.4.3	Signaltransduktionsexperimente mit DMPC/DPPC-Liposomen	- 504 -
5.4.4	Bestimmung der zur Signaltransduktion notwendigen DET- Konzentration	- 521 -
5.4.5	Bestimmung der FRET-Effizienz dotierter Liposomen	- 525 -
5.4.6	Bestimmung der Einlagerungsgeometrie	- 528 -
	Multi-FRET-Experimente mit Eosin 112	- 528 -
	Experimente mit externer Zugabe von Eosin 112	- 530 -
5.4.7	Ausschluss eines interzellulären Energie-Transfers	- 538 -
5.4.8	Bestimmung der Membranpermeabilität	- 540 -
5.5	Signaltransduktionsexperimente mit den Rezeptoren 67 und 121	- 546 -
5.5.1	Signaltransduktionsexperimente mit DMPC/DPPC-Liposomen	- 547 -
5.5.2	Signaltransduktionsexperimente mit den Rezeptoren 67 und 121 in Photopuffer 3	- 564 -
5.5.3	Signaltransduktionsexperimente mit den Rezeptoren 67 und 121 nach modifizierter Liposomenpräparation	- 565 -

5.5.4 Bestimmung der Einlagerungsgeometrie.....	- 567 -
Experimente mit dem Transmembranbaustein 119	- 567 -
5.6 Signaltransduktionsexperimente mit den Rezeptor 123.....	- 571 -
5.6.1 Einlagerung des halben Bausteins 130 in DMPC/DPPC-Liposomen.....	- 572 -
5.6.2 Signaltransduktionsexperimente mit dem Rezeptor 123 in DMPC/DPPC-Liposomen	- 574 -
5.7 Signaltransduktionsexperimente mit den Rezeptoren 138 und 139	- 580 -
5.7.1 Signaltransduktionsexperimente mit den Rezeptoren 138 und 139 , DET als Botenstoff und DTNB (147) zum Nachweis extravasikulärer Thiolgruppen	- 582 -
5.7.2 Signaltransduktionsexperimente mit den Rezeptoren 138 und 139 , DET als Botenstoff und Triphenylphosphin-3,3,3-trisulfonsäure-trinatriumsalz (146) zur Reduktion extravasikulärer Disulfid-Gruppen	- 594 -
5.7.3 Verwendung von Liposomen mit anderer Lipidzusammensetzung für die Rezeptoren 138 und 139	- 597 -
5.7.4 Verwendung anderer Botenstoffe	- 598 -
5.7.5 Ausschluss einer interzellulären Reaktion der Rezeptoren 138 und 139	- 600 -
5.8 Photolyseexperimente mit den Bausteinen 172 und 173.....	- 602 -
5.8.1 Ellman Assay ^[257]	- 602 -
5.8.2 Photolyseexperimente mit der Modellverbindung 172	- 607 -
5.8.3 Photolyseexperimente mit dem halben Baustein 173 in DMPC/DPPC-Liposomen	- 609 -
5.9 Experimente mit dem BIPM-Fluorophor 171	- 611 -
5.9.1 Vorbereitende Experimente mit der Modellverbindung 171	- 611 -
5.9.2 Fluoreszenzaktivierung von BIPM-COOMe 171 mit <i>N</i> -Ac-cystein-OH	- 612 -
5.10 Bestimmung der Phasenübergangstemperaturen.....	- 614 -
5.10.1 Bestimmung der Phasenübergangstemperatur von DMPC/DPPC-Liposomen.....	- 617 -
5.10.2 Bestimmung der Phasenübergangstemperaturen dotierter DMPC/DPPC-Liposomen	- 626 -
Dotierung mit monomeren funktionalisierten Lithocholsäurederivaten.....	- 627 -
Dotierung mit dimeren funktionalisierten Lithocholsäurederivaten	- 633 -
6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	- 639 -
7 LITERATURVERZEICHNIS	- 643 -

1 Einleitung

Alles ist miteinander verbunden, die Menschen untereinander biologisch,

mit der Erde chemisch und mit dem Rest des Universums atomar.

Wir sind im Universum und das Universum ist in uns.

(Neil deGrasse Tyson)

Die Entstehung komplexer Lebensformen über Jahrmillionen brachte Lebewesen hervor, denen es scheinbar problemlos möglich ist, sich an extremste Bedingungen anzupassen und unter diesen zu existieren. Die Kommunikation der verschiedenen Zellen in einem Lebewesen hat hierbei eine zentrale Bedeutung. Für die Reaktion auf äußere Veränderungen ist deshalb ein diffiziler Regulations- und Steuerungsapparat erforderlich. Um die Lebensfähigkeit des Organismus zu gewährleisten, ist es Voraussetzung, dass grundlegende Reproduktionsschemata und Entwicklungsprogramme des betrachteten Organismus nicht gefährdet werden. Bei höheren Lebensformen erfolgt die Regulation im Wesentlichen durch drei Mechanismen. Die Körperfunktionen werden durch elektrische Impulse, Konzentrationsgradienten und chemische Botenstoffe gesteuert. Die, auch als Hormone oder Neurotransmitter bezeichneten chemischen Botenstoffe, initiieren durch Weiterleitung eines Signals einen Effekt in einer bestimmten Zielregion. Hierbei treten sie meist nicht in die Zielzelle ein, sondern binden von der Außenseite der cytoplasmatischen Membran an spezielle Transmembranproteine. Durch die Bindung kommt es auf der intrazellulären Seite des Membranproteins zu Reaktionskaskaden, die die eigentlichen zellinternen Prozesse steuern.^[1]

Diesem, als Signaltransduktion bezeichneten Prozess, wird seit einigen Jahren große Aufmerksamkeit geschenkt. Allein die Anzahl der auf diesem Gebiet in Medizin und Chemie vergebenen Nobelpreise^[2] und die Veröffentlichung von mehr als 3000 Publikationen über biomedizinische und pharmazeutische Aspekte von Adrenalinrezeptoren^[3] pro Jahr spiegelt die zentrale Bedeutung solcher Regulationsprozesse wider.^[4-6]

Aus therapeutischer Sicht ist die Inhibierung oder zumindest die Beeinflussung von Signalkaskaden oder Rezeptoren ein wichtiges Ziel, da die Signalleitung einen sehr spezifischen Ablauf hat.^[7] Um gezielte therapeutische Anwendungen erreichen zu können, besteht ein großes Interesse seitens der pharmazeutischen Industrie an diesem komplexen Themengebiet.

1.1 Biochemische Kommunikation und Neurotransmitter

Chemische Neurotransmitter in natürlich auftretenden Signaltransduktionsprozessen lassen sich in Abhängigkeit ihrer Wirkmechanismen in vier Kategorien einteilen. Unterschieden wird zwischen autokriner-, endokriner-, parakriner- und kontaktabhängiger Signaltransduktion, je nachdem, ob die Botenstoffe auf dieselbe Zelle, benachbarte Zellen, weit von der sezernierenden Zelle entfernten Zellen oder durch direkten Kontakt von signalinduzierender Zelle und Zielzelle wirken.

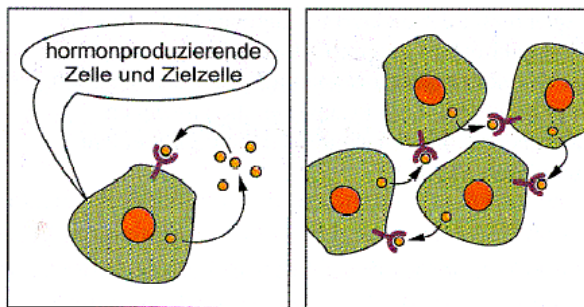


Abbildung 1: Autokrine Signalübertragung.^[9]

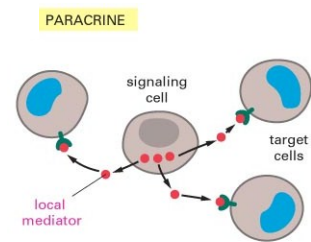


Abbildung 2: Parakrine Signalübertragung.^[9]

Bei der autokrinen Signaltransduktion wirken die Botenstoffe direkt auf die produzierende Zelle zurück (Abbildung 1, links). Parakrine Signale werden von den Zellen in das extrazelluläre Medium freigesetzt. Die Botenstoffe wirken auf Nachbarzellen und bedingen somit eine lokal begrenzte Signalübertragung (Abbildung 2). Auch die kontaktabhängige Signaltransduktion kann als parakrine Signalleitung aufgefasst werden. Die Signale werden durch direkte Zell-Zell-Interaktion mittels membrangebundener Oberflächenmoleküle übertragen. Durch Mitose entstehen Klone der Zellen, die sich wechselseitig stimulieren (Abbildung 1, rechts), woraus resultiert, dass die Grenze zwischen autokriner und parakriner Signalleitung fließend ist.

Der komplexeste Signaltransduktionsprozess des Körpers ist der endokrine, da dieser den Stoffwechsel in vielfältigster Weise beeinflusst und reguliert. Die endokrine Signaltransduktion (Abbildung 3) nutzt den Blutstrom zur Verteilung von Hormonen im menschlichen oder tierischen Organismus. Die Neurotransmitter können an einer vom Bildungsort entfernten Stelle an spezifische Rezeptoren binden, die an den Zellwänden lokalisiert sind. Durch Signalweiterleitung ins Innere der Zellen werden Reaktionskaskaden ausgelöst, die für die Aufrechterhaltung des Stoffwechsels unentbehrlich sind.

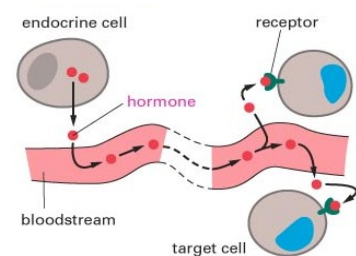
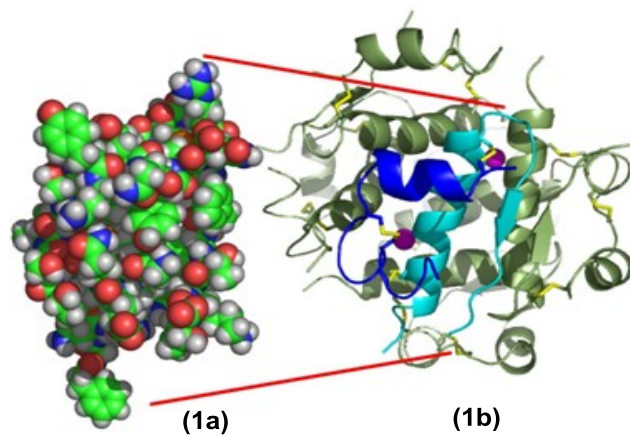


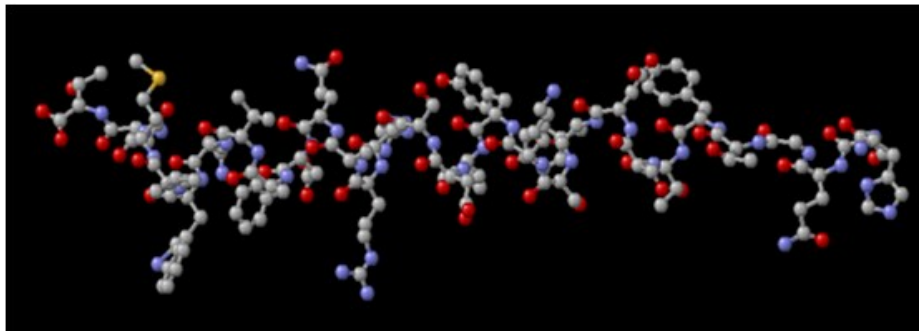
Abbildung 3: Endokrine Signaltransduktion.^[1]

Aufgrund der Vielzahl und der Komplexität der im Körper ablaufenden endokrinen Signalprozesse, soll im Folgenden eine kurze Übersicht der wichtigsten Prozesse vorgestellt werden.

Die Langerhanschen Inseln des Pankreas senden beispielsweise zwei Peptidhormone, Insulin (1) und Glucagon (2), aus, die in Leber- und Fettgewebe für die Freisetzung und Speicherung von Glucose, bzw. Fett sorgen. Die Glucocorticoide beeinflussen den Stoffwechsel in umgekehrter Richtung wie Insulin (1) oder Glucagon (2) und werden in der Nebennierenrinde gebildet. Gastrointestinale Peptidhormone steuern Teile des Verdauungsvorgangs und die aus der Schilddrüse sezernierten iodierten Aminosäurederivate Triiodthyronin (T_3) (3) und Thyroxin (T_4) (4) führen zu einer allgemeinen Anregung des Stoffwechsels, da sie Transkriptionsfaktoren der Zellen aktivieren (Abbildung 4).^[8]



links: Insulinmonomer; rechts: Insulinhexamer



Glucagon (2): Bändermodell

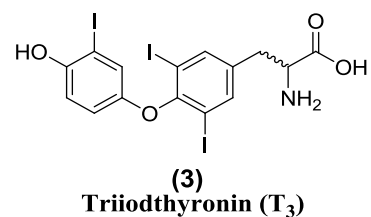
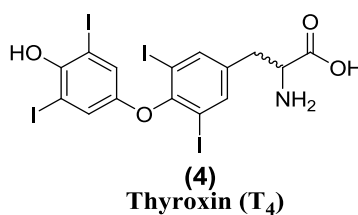
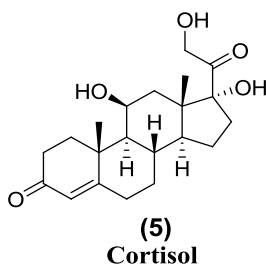


Abbildung 4: Endokrin wirksame Neurotransmitter I.^[10]

Die Regulierung des Ca^{2+} -Stoffwechsel erfolgt durch Konzentrationsänderungen von PTH (Parathyrin) (6), Vitamin D_3 (7) und Calcitonin (8) (Abbildung 5). Dabei lassen PTH (Parathyrin) (6) und Vitamin D_3 (7) die Ca^{2+} -Konzentration im Blut ansteigen, da durch ihre Wirkung Ca^{2+} -Ionen aus den Knochen desorbiert werden und ihre Adsorptionen an Nieren- und Darmgewebe stimuliert wird. Als Antagonist wirkt in diesem Fall das Calcitonin (8) (Abbildung 5). Vitamin D_3 (7) ist ein nicht-körpereigenes Steroidderivat, das dem Körper durch Nahrungsaufnahme zugeführt werden muss. Es wird in der Leber und den Nieren weiter umgesetzt und stimuliert im Folgenden die Synthese des Ca^{2+} -bindenden Proteins, welches im Darmepithel lokalisiert ist.^[8]

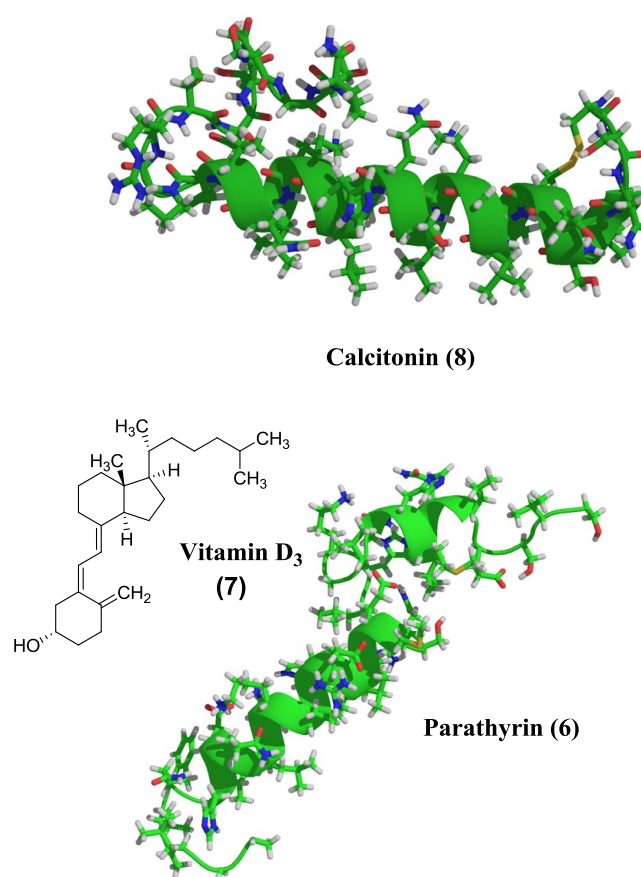


Abbildung 5: Endokrin wirksame Neurotransmitter II.^[10]

Stresshormone wie Adrenalin (9) und Noradrenalin (10) sind zwei im Nebennierenmark produzierte Neurotransmitter, die an die α - und β -adrenergen Rezeptoren binden. Hierdurch kommt es zu einer nachgeschalteten Enzymkaskade, aus der die Ausschüttung großer Mengen an Glucose (3) resultiert und der Körper so auf „Flucht oder Kampf“ vorbereitet wird. Der Wirkmechanismus des biogenen Amins Adrenalin (9) am β -adrenergen Rezeptor wird in Kapitel 1.1.4 noch näher erläutert.

Die Steroidhormone stellen eine besondere Klasse von Neurotransmittern dar. Aufgrund ihrer ausgeprägten Hydrophobie sind sie im wässrigen Medium schlecht löslich. Genau genommen lösen sie sich sowohl in polaren als auch in unpolaren Medien nur in begrenztem Umfang. Wären sie streng genommen lipophil, wäre die Bindung im Fettgewebe nahezu irreversibel. Andererseits sind gänzlich wasserunlösliche Substanzen kaum geeignet, hormonale Funktionen auszuüben, da diese auf Molekül-Molekül-Wechselwirkungen basieren, die sich allesamt im wässrigen Milieu abspielen. Abbildung 6 zeigt eine Übersicht der Steroidhormonbiosynthese. Ausgehend von Cholesterol **(11)** werden insgesamt fünf Klassen (Progestagene, Androgene, Estrogene, Glucocorticoide und Mineralcorticoide) von Steroidhormonen oder deren Precursoren im menschlichen Körper synthetisiert.^[1,8] Der physikochemische Charakter der Steroidhormone ermöglicht es ihnen, verschiedene Zellfunktionen auf anderen Wegen als Peptid-bzw. Proteohormone zu beeinflussen.

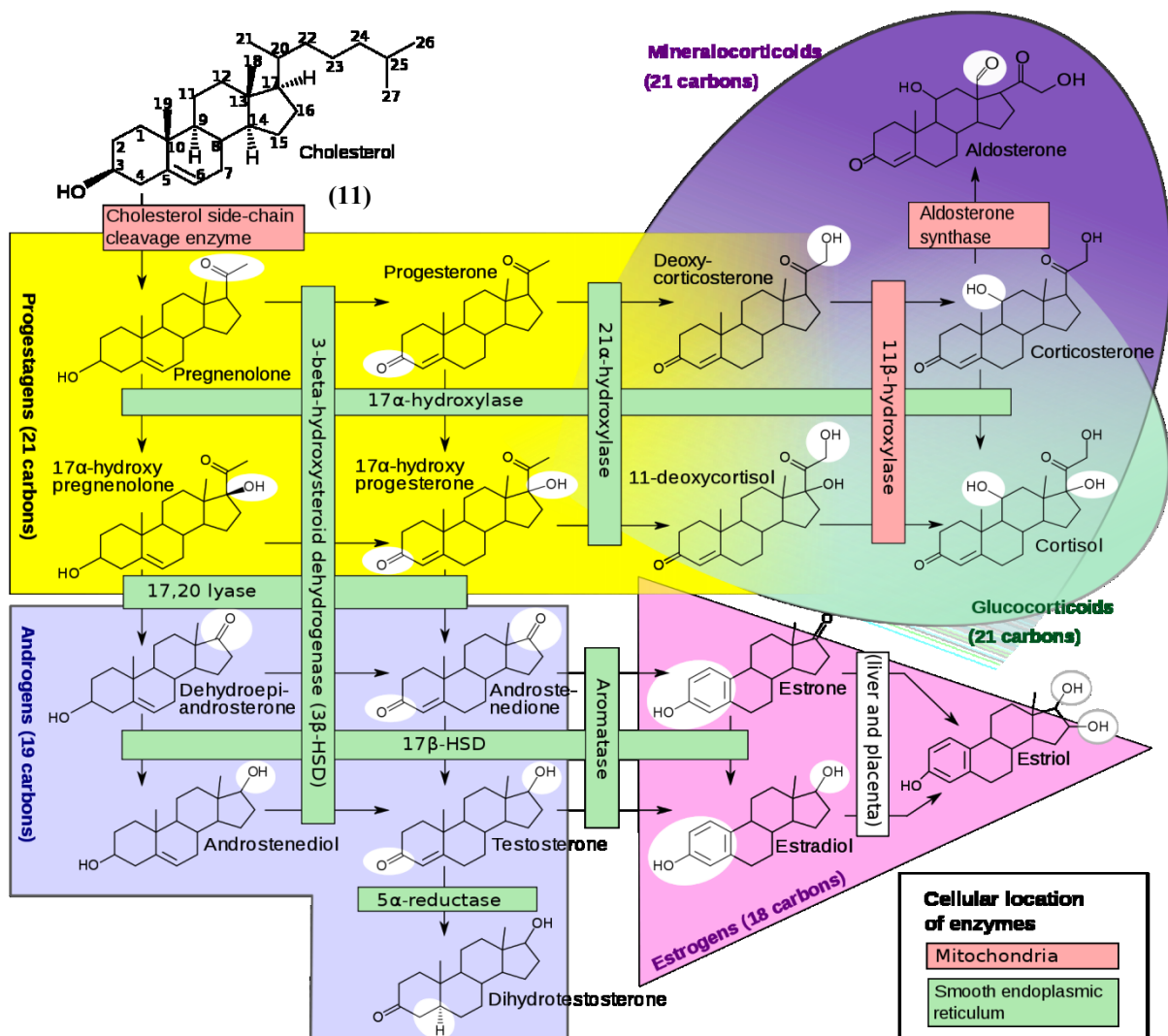


Abbildung 6: Steroidhormonbiosynthese.^[11]

Steroidhormone als unpolare Moleküle sind dazu befähigt, die Plasmamembran ihrer Zielzellen zu durchdringen. Im cytosolischen Medium sind sie dann in der Lage, an ihren zugehörigen Rezeptoren zu binden. Über die Bindung der beiden Partner kommt es zur Aktivierung des Steroid-Hormon-Rezeptors, der daraufhin als Komplex mit dem Hormon über Poren in der Hülle des Zellkerns direkt in das Mitochondrium der Zelle vordringen kann. Der schematische Aufbau eines Steroid-Hormon-Rezeptors ist in Abbildung 7 dargestellt.

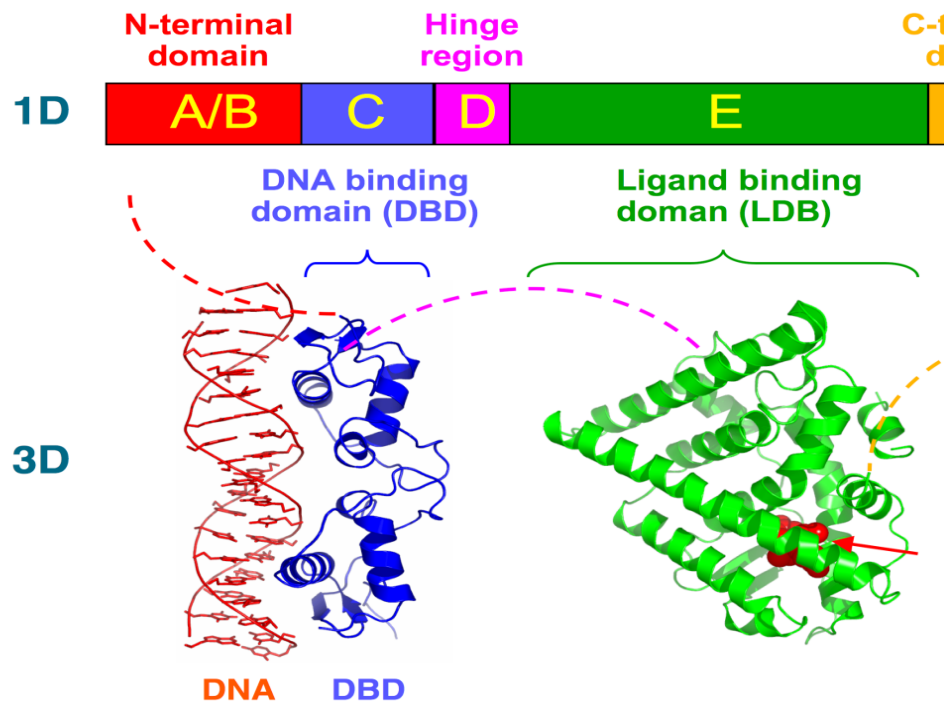


Abbildung 7: Schematische Darstellung eines Steroid-Hormon-Rezeptors.^[11]

Er besteht aus einer N-terminalen Regulator-Domäne, einer DNA-bindenden Domäne, aufgebaut aus zwei Zinkfinger-Motiven, einer Liganden-Bindungsdomäne, die spezifisch für ein bestimmtes Steroidhormon ist, und einer C-terminalen Domäne, die je nach Funktion variabel ist. Die Aktivierung durch Bindung des Hormons hat eine Strukturänderung des Rezeptors zur Folge. Diese Konformationsänderung befähigt sie zur Bindung weiterer Moleküle. Das sind insbesondere DNA-Stränge bzw. spezifische DNA-Sequenzen im regulatorischen Abschnitt bestimmter Gene. Weiterhin lagern sich an der DNA jeweils zwei aktivierte Rezeptoren zu einem Paar zusammen. Drittens nehmen die Rezeptor-Paare Kontakt zu Proteinen auf, die insgesamt einen sogenannten Transkriptionsapparat bilden. Dieses komplizierte Zusammenspiel verschiedener Biomoleküle dient letztlich nur dem Zweck, die vermehrte Bildung von Proteinen zu stimulieren, und zwar solcher Proteine, in deren regulatorischen Gen-Abschnitt sich jeweils spezifische DNA-Sequenzen für einen bestimmten Steroidhormon-Rezeptor befinden.

Bei den Steroidhormon-beeinflussten Proteinen handelt es sich zumeist um solche Biomoleküle, die in den jeweiligen Zielzellen Schlüsselstellungen einnehmen, d.h. solche Moleküle, die für spezielle Funktionen von Bedeutung sind. Steroidhormon-Rezeptor ist ein Sammelbegriff für eine große Familie von Proteinen. Neben den eigentlichen Steroidhormon-Rezeptoren für die Steroidhormone gehören auch die Rezeptoren für Schilddrüsenhormone, für Vitamin D (7) und eine Reihe weiterer Substanzen, die nicht alle Hormone sind, in diese Überfamilie. Alle diese Rezeptoren funktionieren nach dem gleichen Prinzip. Abbildung 8 zeigt einen typischen Steroidhormon-induzierten Signalweg.

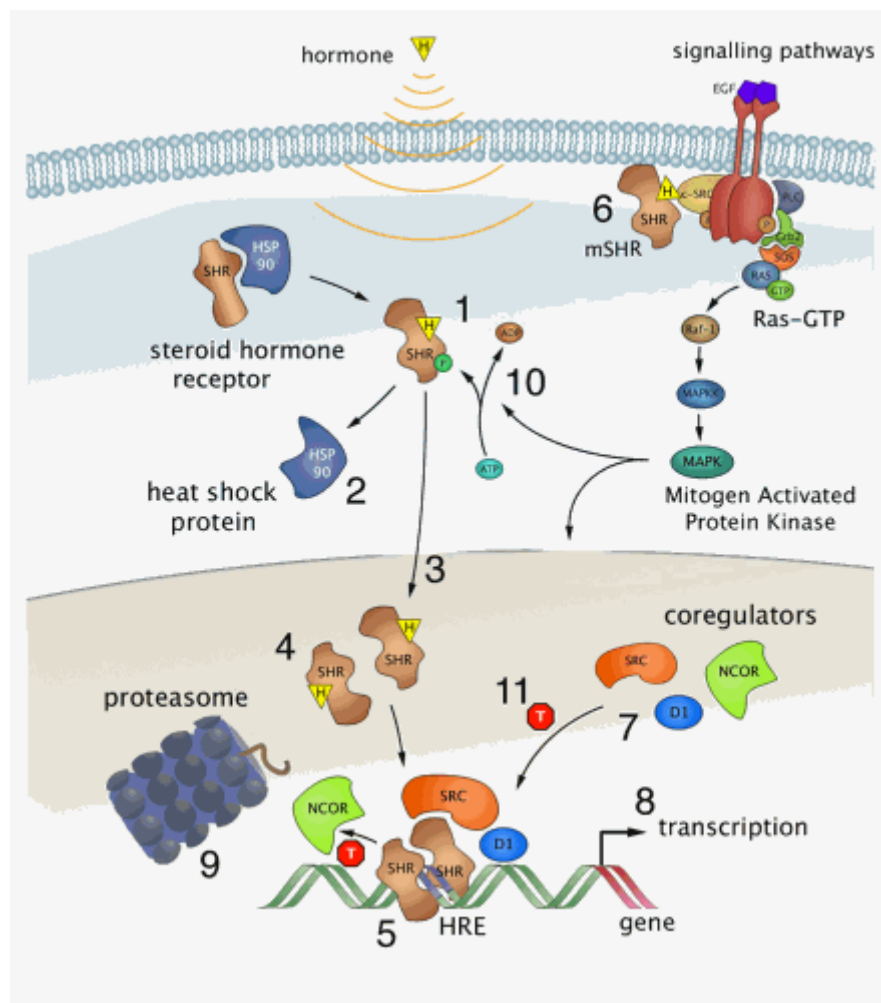


Abbildung 8: Verallgemeinerter Signalweg eines Steroid-Hormon-Rezeptors: Hormon-Bindung (1), Chaperon-Wechselwirkung (2), Zelltranslokation (3), Rezeptor-Dimerisierung (4), DNA-Bindung (5), Membran-gebundener Rezeptor (6), Coregulator (7), Transkription (8), proteasomale Zersetzung (9), Modulation zellulärer Signalwege (10), antagonistische Erkennung (11).^[11]

1.2 Aufbau von Liposomen und Biomembranen

Biologische Membrane sind vielfältig in ihrer Struktur und üben unterschiedlichste Funktionen aus. Trotzdem gibt es viele Gemeinsamkeiten, welche die Grundlage dieser Vielfalt an Funktionen bilden. Gemeinsam ist ihnen die blattartige Struktur, die geschlossene Grenzen zwischen Kompartimenten bildet und typischerweise eine Membrandicke zwischen 6 - 10 nm aufweist. Aufgebaut wird diese Membran aus Protein- und Lipidmolekülen, die über nicht-kovalente Wechselwirkungen zusammengehalten werden. Diese Membrane, die entweder ganze Zellen oder Organellen innerhalb einer Zelle darstellen, sind hochselektive Permeabilitätsschranken, die über assoziierte Membranproteine Regulationsmechanismen zwischen den Kompartimenten übernehmen. Zudem kontrollieren sie den interzellulären Austausch von Informa-

tionen.^[12] Zu den biologisch wichtigsten Eigenschaften der zum Aufbau der Membran verwendeten Lipide gehört deren hydrophobes Verhalten. Diese Eigenschaft ist im Wesentlichen auf ihren strukturbildenden Fettsäurerest zurück zu führen. Fettsäuren in biologischen Systemen besitzen typischerweise 14 - 24 Kohlenstoffatome. Dabei können die langen Alkylketten gesättigt sein bzw. eine oder

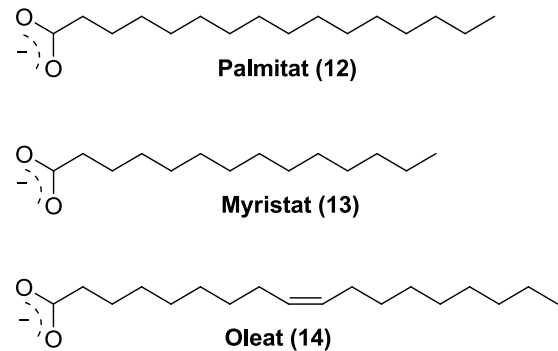


Abbildung 9: Struktur dreier Fettsäurereste.

mehrere Doppelbindungen enthalten. Die in Abbildung 9 gezeigten Palmitat **12**- und Oleatrete **14** kommen am Häufigsten vor. Die Eigenschaften der Fettsäuren und der von ihnen abgeleiteten Lipide hängen deutlich von der Kettenlänge und der Anzahl der Doppelbindungen ab. Kurze Alkylketten und Doppelbindungen erniedrigen den Schmelzpunkt und erhöhen die Fluidität der Fettsäuren und ihrer Lipidderivate.^[1,12] Neben ihrer hier betrachteten Funktion als Membranbausteine haben Lipide ein breites Spektrum an biologischen Funktionen. Sie dienen ebenso als Brennstoffmoleküle, als hochangereicherte Energiespeicher und als Botenstoffe. Die drei Hauptgruppen der Membranlipide sind die Phospholipide, Glycolipide und Cholesterol (**11**). Phospholipide kommen in allen biologischen Membranen vor und stellen somit den größten Anteil der Membranlipide dar. Die Phospholipide lassen sich in zwei weitere große Gruppen unterteilen, die Phosphoglyceride und die Sphingolipide. Die Phospholipidmoleküle sind nach einem einheitlichen Schema aus vier Komponenten aufgebaut: Zwei Fettsäurereste sind kovalent an eine Plattform gebunden.

Diese kann entweder Glycerin (**15**) oder Sphingosin (**16**) sein. Im Falle des Glycerins erhält man Phosphoglyceride. Neben den beiden Fettsäurerestern an C₁ und C₂, ist an das Glycerinrückgrad ein phosphorylierter Alkohol gebunden (Abbildung 10). Ist die Hydroxygruppe an C₃ dagegen nur mit Phosphorsäure verestert, liegt das einfachste Phosphoglycerid vor. Das Phosphatid ist die Schlüsselsubstanz in der Biosynthese der membranbildenden Lipide (Abbildung 11). Die wichtigsten membranbildenden Phosphoglyceride entstehen durch Veresterung der Phosphatgruppe des Phosphatids und einer oder mehrerer Hydroxylgruppen des Alkohols. Die am Häufigsten in Phosphoglyceriden vorkommenden Alkoholkomponenten sind die Aminosäure Serin (**17**), Ethanolamin (**18**), Cholin (**19**), Glycerin (**15**) oder Inositol (**20**).^[1,12] In Abbildung 12 sind die Strukturformel der verschiedenen Alkoholkomponenten und der daraus resultierenden Phospholipide gezeigt.

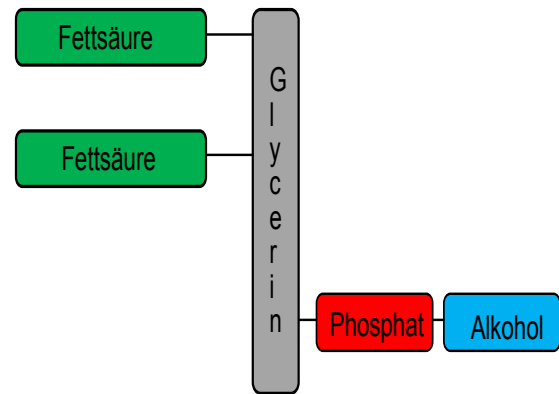


Abbildung 10: Strukturschema eines Phospholipids.

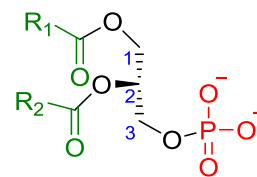


Abbildung 11: Struktur des Phosphatids.

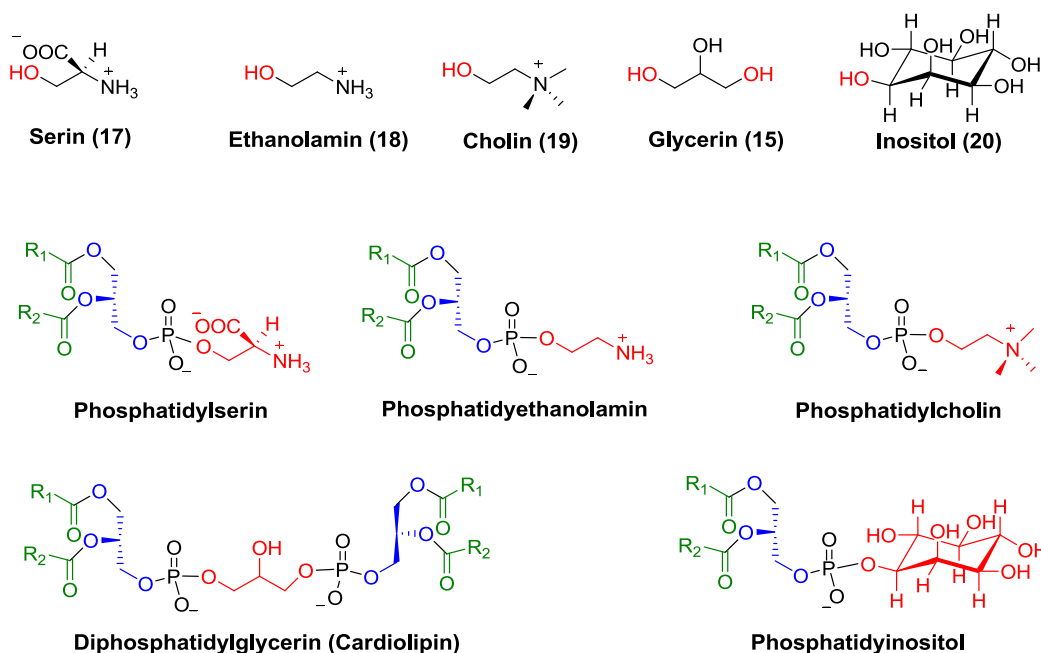


Abbildung 12: Alkoholkomponenten der am häufigsten vorkommenden membranbildenden Phosphoglyceride.

Der zweite Vertreter der Phospholipide stammt aus der Gruppe der Sphingolipide. Sie sind ebenfalls ein Hauptbestandteil von Biomembranen. Sie leiten sich von den C₁₈-Aminoalkoholen Sphingosin **(16)** und Dihydrosphingosin **(21)** und ihrer C₁₇-C₂₀-Homologen

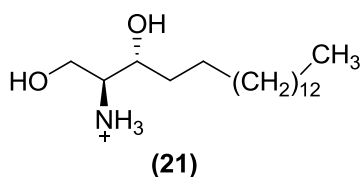
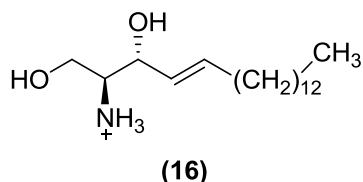


Abbildung 13: Die Aminoalkohole Sphingosin (16) und Dihydrosphingosin (21).

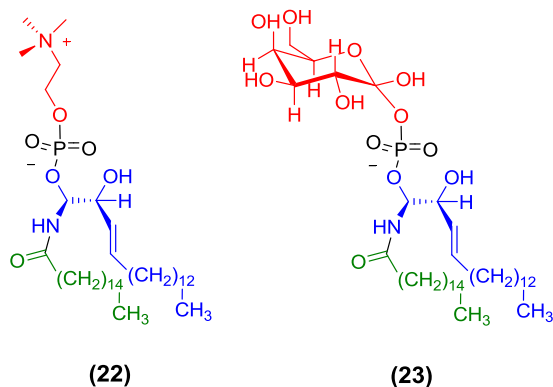


Abbildung 14: Sphingomyelin (22) und Galactocerebroside (23).

ab (Abbildung 13). Ihre N-acylierten Derivate, die Ceramide, kommen selbst nur in geringen Mengen in Pflanzen und Tieren vor. Sie sind aber die Schlüsselsubstanzen zur Bildung häufig vorkommender Sphingolipide. Die Gruppe der Sphingomyeline sind Ceramide, die eine Phosphocholin- oder Phosphatidylethanolamin-Kopfgruppe tragen. Obwohl sich Sphingomyeline chemisch von Phosphatidylcholinen und -ethanolaminen unterscheiden, sind Struktur und Ladungsverteilung sehr ähnlich (Abbildung 14). Sphingomyelin **(22)** ist Hauptbestandteil einer Membran, die Nervenzell-Axone umgibt, und fungiert in dieser Membran als elektrischer Isolator. Die wichtigste Gemeinsamkeit und Eigenschaft der Phospholipide ist die Ladungsverteilung. Die Fettsäuren bilden die hydrophobe Grenze. Die Kopfgruppen besitzen hydrophile Eigenschaften und ermöglichen eine Wechselwirkung mit der polaren Umgebung.^[1] Die zweite Hauptgruppe

der Membranlipide sind die Glycolipide. Die Glycolipide leiten sich wie das Sphingomyelin **(22)** von Sphingosin **(16)** ab. Auch bei dieser Klasse ist die Aminogruppe mit einer Fettsäure acyliert. Der Unterschied zu den Phospholipiden liegt in der Kopfgruppe. Die primäre Hydroxyfunktion ist nicht mit einem phosphoryliertem Alkohol substituiert, sondern mit einer oder mehreren Kohlehydrateinheiten. Sie sind daher ungeladen und weitaus lipophiler als die Phospholipide. Sie werden vollkommen unsymmetrisch in Membranen eingelagert, wobei die Kohlehydrateinheiten sich immer auf der Außenseite der Membran befinden. Die Cerebroside sind die einfachsten Vertreter dieser Klasse von Membranlipiden. Sie besitzen nur einen Kohlenhydratrest, entweder Glukose oder Galactose. In Abbildung 14 ist das Ga-

lactocerebrosid (**23**) gezeigt. Es ist essentiell für die Nervenzellen im Gehirn. Die Ganglioside sind die komplexesten Sphingoglycolipide. Sie weisen Kopfgruppen mit verzweigten Ketten mit bis zu sieben Kohlenhydrateinheiten auf. Sie sind primärer Membranbestandteil und stellen mit 6 % einen merklichen Anteil der Gehirnlipide. Physiologisch und medizinisch gesehen haben sie eine große Bedeutung. Sie fungieren als spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche der Zellmembran. Ihre Kohlenhydratkopfgruppen können dabei selektiv Glycoprotein-Hormone erkennen. Des Weiteren sind sie am Aufbau spezifischer Determinanten der Zell-Zell-Erkennung beteiligt und spielen somit bei der Differenzierung von Geweben und beim Wachstum eine große Rolle.^[1,12] Der dritte Hauptvertreter der Membranlipide ist das Cholesterol (**11**). Es ist Hauptbestandteil der Plasmamembran von Säugern und kommt in kleineren Mengen in den Membranen subzellulärer Organellen vor. In seiner Struktur unterscheidet es sich völlig von den anderen Membranlipiden. Es besitzt einen hydrophoben Rest, der aus einem kondensierten Cyclopent[*a*]phenatren-Ringsystem aufgebaut

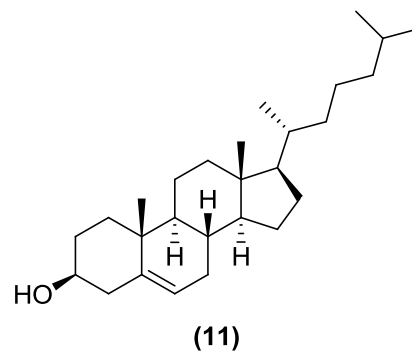


Abbildung 15: Struktur des Cholesterols (**11**).

ist. Verglichen mit den anderen Membranlipiden weist dieser Rest eine sehr große Rigidität auf. Leicht amphiphilen Charakter erhält das Cholesterol (**11**) durch die polare Hydroxylkopfgruppe (Abbildung 15). In Membranen ist Cholesterol (**11**) parallel zu den langen Alkylketten der Phospholipide ausgerichtet. Die Hydroxylgruppe tritt dabei mit den hydrophilen Phosphatgruppen in zusätzliche Wechselwirkung.^[1,12]

Die Fähigkeit, Membranen auszubilden, ist die Konsequenz der amphipatischen Natur der Lipidmoleküle. Die hydrophilen Kopfgruppen begünstigen die Wechselwirkung mit dem wässrigen Medium, die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Kohlenwasserstoffketten sind die treibende Kraft der Membranbildung. Es gibt im wässrigen Medium prinzipiell zwei unterschiedliche Anordnungsmöglichkeiten, bei denen den vollkommen entgegengesetzten Eigenschaften des hydrophoben und hydrophilen Anteils eines Membranlipids Rechnung getragen werden kann. Eine Möglichkeit ist die Bildung einer Micelle. Sie besitzt eine globuläre Struktur, in der die hydrophilen Kopfgruppen durch das wässrige Medium solvatisiert sind. Die hydrophoben Fettsäurereste treten dabei untereinander in van-der-Waals-Wechselwirkung. Diese Anordnung bevorzugen vor allem einkettige Lipide mit konischem van-der-Waals-Umriss (Abbildung 16) wie z.B. ionische Tenside und Detergenzien. Die Micellenbildung ist ein kooperativer Prozess. In einer verdünnten wässrigen

Lösung von Amphiphilen bilden sich die Micellen oberhalb einer bestimmten kritischen Micellenkonzentration (CMC) und oberhalb der Kraft-Temperatur, da sonst der Abschirmungseffekt auf die hydrophoben Gruppen durch die Micelle nicht möglich ist.^[1] Die Micel-

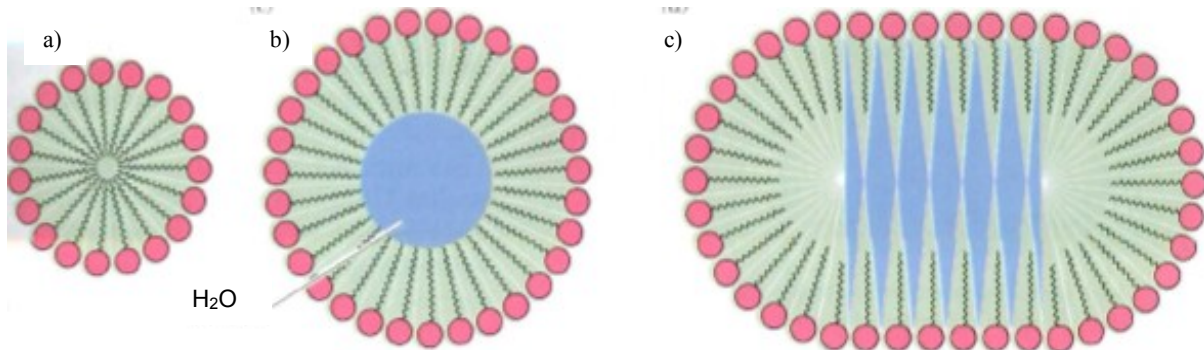


Abbildung 16: a) Kugelförmige Micelle b) große Kugel-Micelle mit energetisch ungünstigem, wassergefülltem Zentrum c) abgeflachte Ellipsoid-Micelle mit wassergefüllten Zwischenräumen.^[1]

len sind Molekülcluster in der Größe typischer Kolloidteilchen.^[1,8,13] Die Gestalt und die Größe der Micellen kann in erster Näherung durch geometrische Überlegungen vorausgesagt werden. Beide leiten sich aus der Anzahl der zur Micellenbildung herangezogenen Lipidmoleküle ab. Für ein gegebenes Amphiphil liegt diese Zahl in einem engen Bereich, da Durchmesser und Lipidpopulation weitgehend von der Länge der Alkylketten abhängen. Unterhalb der CMC wird der hydrophobe Kern der Micelle dem umgebenden Wasser ausgesetzt. Damit ist die Micelle nicht stabil und zerfällt, da die hydrophoben Wechselwirkungen minimiert werden. Oberhalb der CMC bildet praktisch jedes zugesetzte Amphiphil kugelförmige Micellen. In dieser Struktur können hydrophobe und hydrophile Gruppen optimal miteinander wechselwirken (Abbildung 16a). Eine Erhöhung der Lipidkonzentration weit über die CMC hat zur Folge, dass sich der Durchmesser der Micelle stark vergrößert. Dabei bildet sich innerhalb dieser Kugel-Micellen ein wassergefülltes Zentrum, aus dem wiederum ein energetisch ungünstiger Zustand resultiert, da die hydrophoben Wechselwirkungen durch das Eindringen von Wassermolekülen herabgesetzt werden (Abbildung 16b). Um dieses wässrige Kompartiment zu minimieren, können diese Micellen abflachen und Ellipsoid-Micellen bilden. Mit abfallender Krümmung der sich ebnenden Oberfläche entstehen wiederum Spalten zwischen den Lipidmolekülen, so dass diese Form von Micellen wassergefüllte Zwischenräume besitzen, die ebenfalls keine optimalen hydrophoben Wechselwirkungen zulassen (Abbildung 16c).^[1,14] Die Glycerophospholipide und Sphingolipide (Abbildung 12, 14) besitzen aufgrund der zwei Kohlenwasserstoffketten einen rechteckigen van-der-Waals-Umriss (Abbildung 17a).

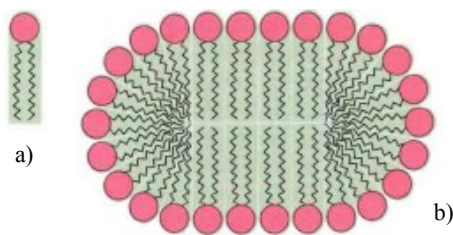


Abbildung 17: a) rechteckiger van-der-Waals-Umriss
b) diskusähnliche Micelle.^[1]

Dieser führt zur Bildung einer diskusähnlichen Micelle, die besser als Lipiddoppelschicht beschrieben werden kann (Abbildung 17b). Die Existenz solcher Lipiddoppelschichten wurde erstmalig von *E. Gorter* und *F. Grendel* diskutiert.^[15] Sie extrahierten aus der Plasmamembran von Erythrocyten Lipide, die an der Phasen-

grenze Luft-Wasser als Monolayer eine doppelt so große Oberfläche einnahmen wie in der Erythrocytenmembran. Die Eigenschaft, dass Phospholipide in wässriger Lösung Doppelschichten anstatt Micellen bilden, ist von fundamentaler biologischer Bedeutung. Micellen sind eng begrenzte Strukturen, die für gewöhnlich einen Durchmesser von 20 nm aufweisen. Bimolekulare Schichten hingegen können makroskopische Dimensionen im Millimeterbereich erreichen.^[16] Die Ausbildung von Lipiddoppelschichten ist ein Prozess der Selbstorganisation (*self-assembly*), d.h. die Struktur ist in den molekularen Eigenschaften der sie aufbauenden Lipidmoleküle festgelegt. Bei der Einlagerung der Kohlenwasserstoffketten in das unpolare Innere der Doppelschichten werden Wassermoleküle verdrängt. Die van-der-Waals-Kräfte zwischen den Kohlenwasserstoffketten begünstigen eine enge Packung der Ketten. Die sich ausbildenden elektrostatischen Wechselwirkungen und die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den polaren Kopfgruppen und den Wassermolekülen der Umgebung führen zu einem weiteren erheblichen Energiebeitrag. Lipiddoppelschichten werden somit sowohl durch entropische als auch enthalpische Energiebeiträge stabilisiert.^[12] Diese synergetischen Wechselwirkungen führen zu kooperativen Strukturen, welche drei signifikante Konsequenzen mit sich bringen. Lipiddoppelschichten sind bestrebt zu expandieren, neigen zum *self-assembly* und sind selbst-reparierend, da jegliche Störstellen die Membran energetisch destabilisieren. Die membranbildenden Eigenschaften der Phospholipide können als wichtiges experimentelles und medizinisches Instrument eingesetzt werden. Lipidvesikel oder Liposomen sind wässrige, geschlossene, sich selbst versiegelnde Kompartimente, die

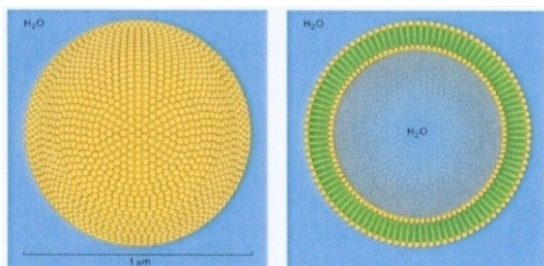


Abbildung 18: links: großes unilamellares Liposom, rechts: liposombildende Lipiddoppelschicht.^[3]

von einer Lipiddoppelschicht umgeben sind (Abbildung 18, rechts). Durch eine Suspension von Phospholipiden in Wasser bilden sich multilamellare Vesikel (MLV) mit einer zwiebel-artig ineinander angeordneten Membran und einem Durch-

messer von 400 nm. Weisen die Liposomen nur eine Doppelschicht auf, spricht man von unilamellaren Vesikeln. Die kleinsten unilamellaren Vesikel (SUV = small unilamellar vesicles) haben einen Durchmesser von 20 nm bis 50 nm und können durch Ultraschallbehandlung einer Suspension von Phospholipiden in wässriger Lösung hergestellt werden. Größere Vesikel (LUV = large unilamellar vesicles) weisen Durchmesser in der Größenordnung von 200 nm bis 800 nm auf. Sie können entweder durch Injektion einer ethanolischen Lösung von Phospholipiden in Wasser oder mittels Extrusion hergestellt werden.^[17] Hierbei wird eine Lösung multilamellarer Liposomen mehrfach durch eine Polycarbonatmembran definierter Porengröße extrudiert. Ferner gibt es große multilamellare Vesikel (LMLV = large multilamellar vesicles), die Größenordnungen zwischen 1 μm und 10 μm erreichen und sogenannte Riesenliposomen mit Durchmessern von über 20 μm .^[18-21] Einmal gebildet, sind Liposomen im Gegensatz zu Micellen, die aufgrund dynamischer Bildungs- und Zerfallsprozesse nur wenige Millisekunden ein abgeschlossenes Kompartiment bilden, sehr stabil.^[14] Sie können durch Gelfiltration oder Zentrifugation getrennt werden. Somit besteht die Möglichkeit Liposomen mit unterschiedlichem Inneren und Äußeren Milieu zu präparieren. Die Lipiddoppelschichten der Liposomen können als zweidimensionale Flüssigkeiten betrachtet werden. Die Kohlenwasserstoffketten der Lipide führen andauernd wechselnde Fließbewegungen aus, die auf die Rotation der C-C-Bindungen zurückzuführen sind. Man bezeichnet diesen sehr schnell ablaufenden Prozess ($\sim 10^{-6}$ s)

als laterale Diffusion (Abbildung 19).^[22] Somit ist der schnelle Transfer eines Lipidmoleküls im gleichen Blatt der Lipiddoppelschicht möglich. Die transversale Diffusion (Abbildung 19) eines Lipidmoleküls, auch als Flip-Flop bezeichnet, be-

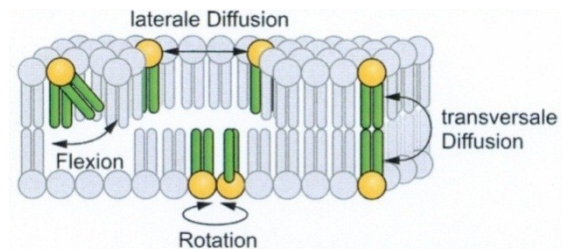


Abbildung 19: Lateral- und Transversaldiffusion.^[3]

schreibt den Austausch von Phospholipidmolekülen zwischen den Blättern der Doppelschicht.^[23,24] Im Gegensatz zur lateralen Diffusion ist dieser Prozess sehr langsam ($\sim 10^5$ s). Dies lässt sich dadurch erklären, dass bei der transversalen Diffusion die kooperative Struktur der Doppelschicht erheblich gestört wird und somit energetisch sehr ungünstig ist. Phospholipidmembranen können bei unterschiedlichen Temperaturen in verschiedenen Zuständen vorliegen. Die Phasenübergänge lassen sich auf unterschiedlichen Wegen detektieren. Eine Möglichkeit sind kalorimetrische Methoden wie die Mikrokalorimetrie.^[25] Des Weiteren sind auch Fluoreszenzsonden wie Laurdan **(24)**^[26,27] und Prodan^[28] oder Filmwaagenexperimente^[29] geeignet, um detaillierte Informationen über die Phasenübergänge zu gewinnen. Bei einem, mit dem größten Enthalpieumsatz verbundenen

Übergang gehen Lipidmoleküle in der Doppelschicht von einem geordneten Fest- oder Gelzustand (Abbildung 20a, 21a) in einen relativ ungeordneten, flüssigkristallinen Zustand (Abbildung 20c, 21b) über. Die, für reine Lipide scharf abgegrenzte Temperatur des Ordnung-Unordnung-Übergangs, wird Phasenübergangstemperatur T_m genannt. Die Übergangstemperatur T_m einer Doppelschicht steigt mit zunehmender Kettenlänge und ab-

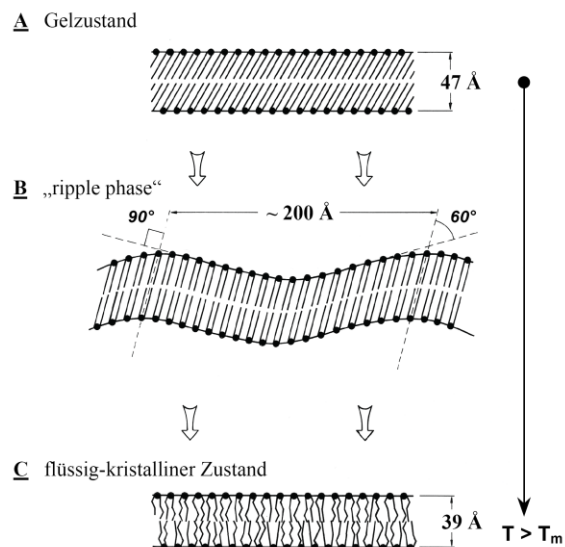


Abbildung 20: Schematische Darstellung der Struktur einer Phosphatidylcholin-Membran bei verschiedenen Phasenzuständen.

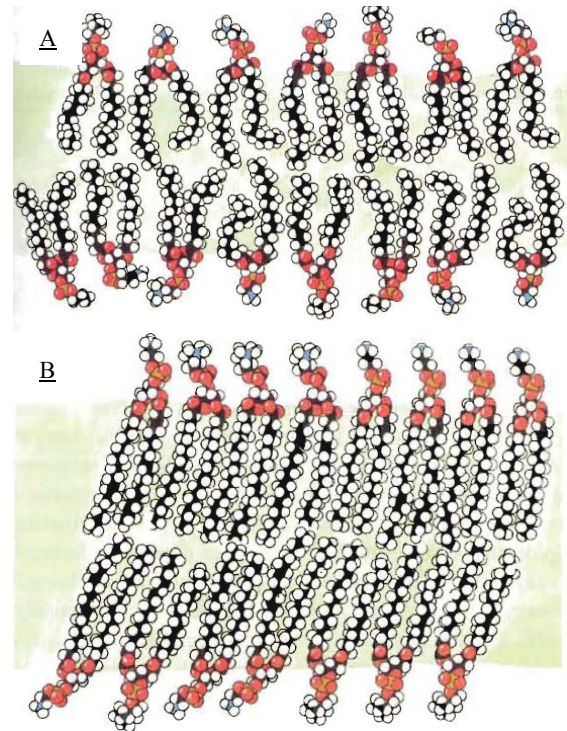


Abbildung 21: Kalottenmodell des Phasenübergangs einer Phosphatidylcholin-Membran.^[1]

nehmendem Doppelbindungscharakter des Fettsäurerestes des entsprechenden Lipids. Im geordneten Zustand sind die Fettsäureketten relativ dicht gepackt und maximal gestreckt. Die energetisch günstige antiperiplanare *all-trans*-Konformation der C-C-Einfachbindungen und die, bei längeren Kohlenwasserstoffketten stärker ausgeprägten van-der-Waals-Wechselwirkungen, begünstigen die starre Anordnung (Abbildung 20a, 21a). Die Einführung von vornehmlich *cis*-konfigurierten Doppelbindungen, die einen Knick in der Kohlenwasserstoffkette verursachen, stört die geordnete Packung. Steigt die Temperatur über T_m , erhöht sich die Mobilität der polaren Kopfgruppen und die C-C-Einfachbindungen gehen partiell in die *gauche*-Konformation über, welche einen oder mehrere Kettenknicke verursacht, die sogenannten Kinken. Das einfachste und wichtigste Rotationsisomer mit einer Kinke geht aus der *trans*-Konformation durch Drehung um eine C-C-Einfachbindung hervor.^[30] Dies führt einerseits zu einer Verkürzung der Kettenlänge und andererseits zu einem vergrößerten freien Volumen innerhalb der Membran. In Folge dessen kommt es im flüssig-

kristallinen Zustand bei gleichzeitiger lateraler Expansion der Lipiddoppelschicht (Volumenzunahme) zu einer Abnahme der Schichtdicke (Abbildung 20). Der Ordnungsgrad der Alkylketten im Inneren der Membran ist nach dem Phasenübergang aber nicht so gering wie in freien Kohlenwasserstoffen.^[16] Im Gelzustand sind die Fettsäurereste der Phosphatidylcholin-Doppelschichten um etwa 60° gegen die Membranoberfläche gekippt (Abbildung 20, 21a). Die polaren Kopfgruppen eines Lipidmoleküls hingegen sind parallel zur Membranoberfläche ausgerichtet. Da die, an das quartäre Stickstoffatom gebundenen Methylgruppen der Phosphatidylcholin-Kopfgruppe sehr voluminös sind, weichen die Kohlenwasserstoffketten von ihrer senkrechten Orientierung ab, um dementsprechend den von der Kopfgruppe geschaffenen Raum zu füllen und die hydrophoben Ketten benachbarter Lipidmoleküle einander näher zu bringen. Membranen dieser Struktur zeigen unterhalb der Phasenübergangstemperatur T_m eine Vorumwandlung ($6 - 8^\circ\text{C}$), bei der sich die Kopfgruppen umorientieren und es zu einer Änderung des Neigungswinkels der Fettsäureketten relativ zur Doppelschicht kommt. Dabei wird eine wellenförmige Membranstruktur ausgebildet (*ripple phase*) (Abbildung 20b).^[31] Phosphoglyceride mit Ethanolamin-Kopfgruppen **18**, deren Kohlenwasserstoffketten annähernd senkrecht zur Membranoberfläche stehen, zeigen dieses Vorstadium nicht.^[16] Die, aus dem flüssigkristallinen Zustand resultierende Membranfluidität der Liposomen ist in biologischen Systemen von großer Bedeutung, da sie die Eigenschaften wie Permeabilität, Fusion, Proteinbindung und Aggregation beeinflusst (siehe Kapitel 1.3). Trotz der, oberhalb der Übergangstemperatur T_m vorhandenen Fluidität, sind Lipiddoppelschichten für Ionen und die meisten polaren Moleküle sehr gering permeabel. Wasser stellt hierbei eine wichtige Ausnahme dar. Aufgrund seiner geringen Größe, der hohen Konzentration und der fehlenden echten Ladung, kann es Doppelmembranen ohne weiteres passieren. Die Permeationskoeffizienten kleiner Moleküle stehen mit dem Verhältnis ihrer Löslichkeit in unpolaren Lösungsmitteln zu der Löslichkeit in Wasser in Beziehung (Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient K_{ow}).^[32,33] Abbildung 22 zeigt die Permeabilitätskoeffizienten für ausgewählte bioaktive Moleküle. Wie zuvor erwähnt, kann die Fluidität der Membran durch Variation der Doppelbindungen und der Länge der Alkylketten reguliert werden. Diesen Umstand machen sich die Prokaryoten (Organismen ohne echten Zellkern) zu Nutze, wohingegen die Eukaryoten (Organismen mit echtem Zellkern) die Fluidität der Membran durch Einbau von Cholesterol (**11**) (Abbildung 23) in ihre Membranstruktur bewerkstelligen. Die Hydroxylgruppen der Cholesterolmoleküle **11** sind dabei über Wasserstoffbrückenbindungen in der polaren Kopfregion der Doppelschichten verankert. Das starre Steroidgerüst tritt über hydrophobe Wechselwirkungen mit den Fettsäureresten im

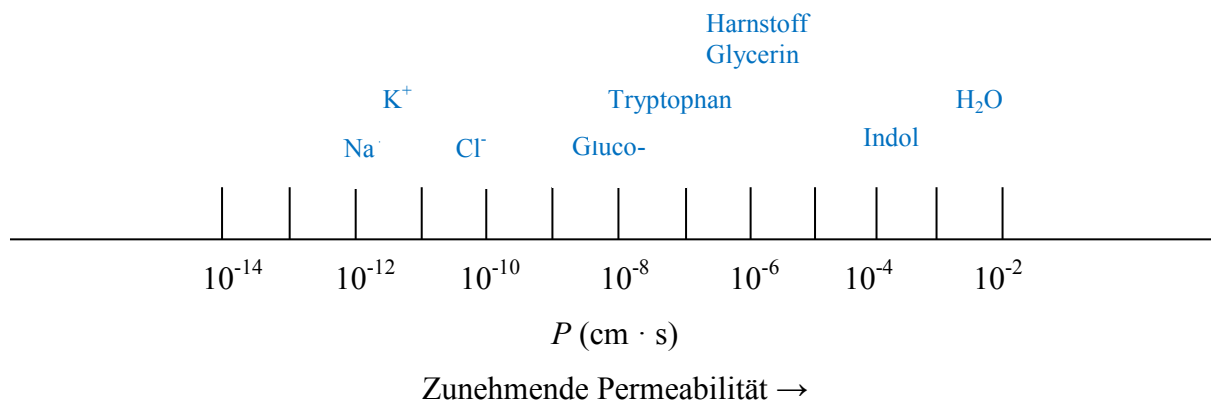


Abbildung 22: Permeabilitätskoeffizienten (P) von Ionen und Molekülen durch eine Lipiddoppelschicht.

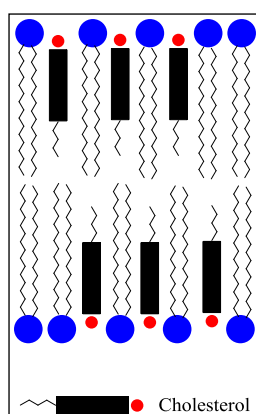


Abbildung 23: Einbau von Cholesterol (11) in eine Doppelmembran.

Inneren eines Blattes der Lipiddoppelschicht in Kontakt. Das molare Verhältnis von Cholesterol (11) zu Phospholipiden kann in eukaryotischen Membranen bis auf 1:1 ansteigen. Cholesterol (11), welches selbst keine Doppelschichten ausbildet, erhöht unterhalb der Phasenübergangstemperatur T_m die Fluidität der Membran, da es als "Fremdkörper" die geordnete Struktur der Alkylketten in der Gelphase stört. In der flüssig-kristallinen Phase oberhalb von T_m wird im Gegensatz dazu die Membranfluidität herabgesetzt, da das rigide Steran-Gerüst des Cholesterols (11) mit den Bewegungen der Kohlenwasserstoffketten interferiert. Die Übergangstemperaturen liegen in biologischen Membranen zwischen 10 °C und 40 °C. Durch den Einbau von Cholesterol (11) wird der Phasenübergangsbereich verbreitert und bei hohen Konzentrationen vollständig unterdrückt. Hierbei drängt es sich als "Weichmacher" zwischen die Fettsäureketten und verhindert die Kristallisation der Lipide.

Zur Detektion der Phasenübergänge von Liposomen stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Zwei weit verbreitete Methoden sind die Filmwaagenmessungen und die Dynamische Differenzkalorimetrie DSC (*engl. Differential Scanning Calorimetry*). Bei den Filmwaagenmessungen werden nicht Liposomen selbst vermessen, sondern monomolekulare Schichten, auch Langmuirfilme genannt. Diese sind quasi-zweidimensionale Schichtsysteme, die aus einem Lipidmonolayer bestehen und durch Spreiten auf einer flüssigen Oberfläche entstehen. Dabei orientieren sich die polaren Kopfgruppen der Lipidmoleküle zur wässrigen Subphase hin; die hydrophoben Alkylreste sind in die Luft gerichtet. Mittels der Filmwaagenteknik lässt sich die, für ein einzelnes Molekül verfügbare Fläche, in der wässrigen Subphase verändern und das Kompressionsverhalten der gespreiteten Monoschicht bestimmen. Der Oberflächendruck π ist hierbei die Differenz der Oberflächenspannung γ_0 der reinen Subphase und der filmbedeckten Oberfläche γ . An einem

Langmuirfilm lässt sich die Ordnung in zwei Dimensionen bestimmen. Die thermodynamischen Parameter Temperatur und Druck lassen sich hierbei sehr gut einstellen. Abbildung 24 zeigt verallgemeinert die Druck-Flächen-Isotherme eines Phospholipids mit zwei Acylketten bei konstanter Temperatur und Teilchenzahl. Es wird unterschieden zwischen isotrope Gas-

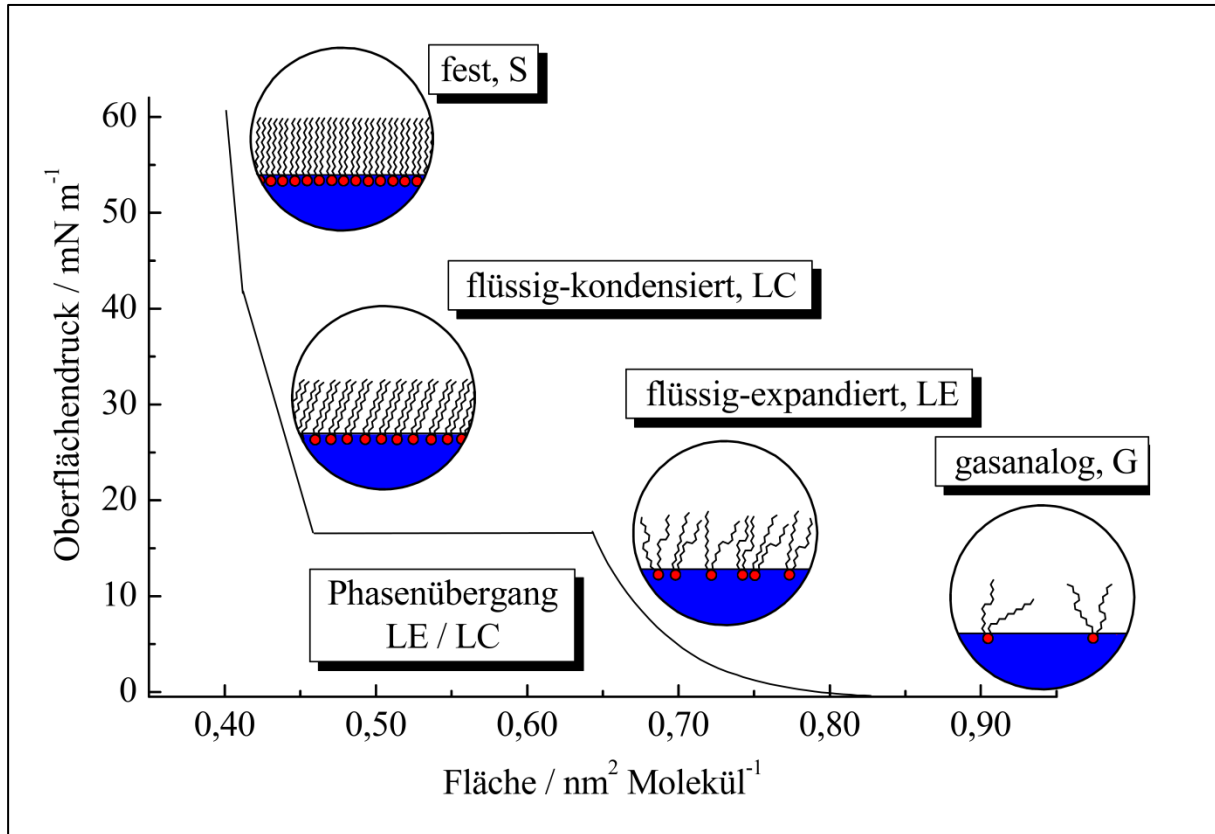


Abbildung 24: Verallgemeinerte π/A -Isotherme eines Phospholipids mit zwei Acylketten.^[8]

phase, expandierter und kondensierter fluider Phase und verschiedenen kristallinen Phasen. Dazwischen liegen Phasenübergänge erster und zweiter Ordnung. Der Übergang von der flüssiganalogen zur festanalogen Phase eines Lipids heißt Hauptumwandlungstemperatur. Durch Aufnahme verschiedener Isothermen bei unterschiedlichen Temperaturen, können die Übergangswärme Δq_m und der Übergangsdruck π_M bestimmt werden. Biologische Relevanz erhalten diese Parameter durch Einlagerung von z.B. Steroiden und Membranproteinen, da deren Beweglichkeit in der Membran stark eingeschränkt wird und über das veränderte Phasenübergangsverhalten detektiert und aus den ermittelten Parametern quantifiziert werden kann. Mit Hilfe der Filmwaagenteknik erhält man somit einen Einblick in das Phasenverhalten von Lipidmonoschichten. Dieses kann aber auf das Phasenverhalten von Lipidmembranen übertragen werden, da Langmuir-Schichten als Hälfte der aus zwei Monoschichten bestehenden biologischen Membran betrachtet werden können.^[34] Die dynamische Differenzkalorimetrie (DSC) steht als Methode zur direkten Bestimmung der Phasenübergangstemperatur T_C zur Verfügung. Mit ihrer Hilfe können Prozesse verfolgt werden, die zu

einer veränderten Enthalpie führen. Man bezeichnet einerseits Prozesse als endotherm, welche zu einer Erniedrigung der Enthalpie führen (Schmelzen, Verdampfen, Glasübergänge) und andererseits solche als exotherm, welche die Enthalpie erhöhen (Kristallisation, Zersetzung, etc.). Zur Messung wird die Differenz der Wärmeströme zwischen einem Proben- und einem leeren Referenztiegel während einem kontrollierten Temperaturgradienten erfasst. Eine Untersuchung flüssiger, amorpher und kristalliner Strukturen ist auf diese Weise möglich. Die DSC kann somit wertvolle Informationen über das Phasenverhalten von Membranen liefern, da Phasenübergangstemperaturen T_C direkt aus der sich ändernden Enthalpie bei einer definierten Temperatur bestimmt werden können.^[13] Abbildung 25 zeigt ein DSC-Thermogramm von DPPC (Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholin) (36 °C Vorum-

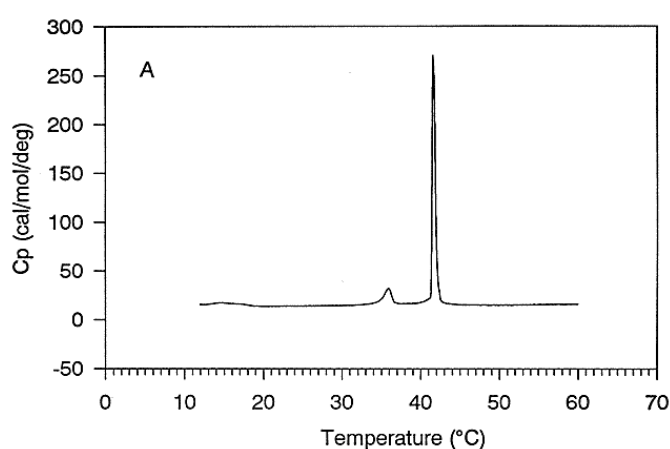


Abbildung 25: DSC-Thermogramm von DPPC (Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholin).^[8]

wandlung; 41 °C Phasenübergang). Die Fluorophore Laurdan (**24**) und Prodan^[35] gehören zu einer Gruppe von Fluorophoren, die, aufgrund eines großen Dipolmoments im elektronisch angeregten Zustand, eine empfindliche Sonde für die Polarität ihrer Umgebung darstellen. Ein besonderes Charakteristikum dieser Verbindungen ist ein stark zunehmender STOKES-Shift der Fluoreszenzemission mit steigender Polarität des umgebenden Lösungsmittels. Aufgrund dieser spektroskopischen Besonderheit werden Fluorophore dieser Familie hauptsächlich als Membransonden eingesetzt.^[26,28] Abbildung 26 zeigt die Lewis-Struktur der Membransonde Laurdan (**24**).

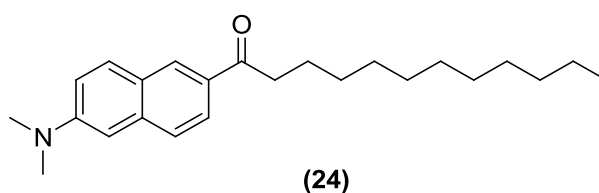


Abbildung 26: Die Fluoreszenz-Sonde Laurdan (**24**).

Die umgebungssensitive Kopfgruppe in Verbindung mit dem Lauroylrest, der zu starken van-der-Waals- und hydrophoben Wechselwirkungen mit den benachbarten Lipidmolekülen befähigt, bietet die Möglichkeit zum Einbau in ein Membransysteme. Somit ist es möglich Veränderungen in der Umgebung des Fluorophors zu detektieren und strukturelle Änderungen in der Membran aufzuzeigen.^[27] Durch den Einbau von Laurdan (**24**) in Modellmembrane konnten Phasenübergänge von Phospholipiden detektiert werden, da sich die Absorptions- und Emissionsspektren von Laurdan (**24**) in der Gelphase und der fluiden Phase deutlich unterscheiden. Eigens zur quantitativen Beschreibung der Phasenkoexistenz wurde das Konzept der „verallgemeinerten Polarisation“ (*Generalized Polarisation, GP*) entwickelt, auf welches im Rahmen dieser Arbeit zurückgegriffen wurde, und später noch näher erläutert werden wird (siehe Kapitel 3.4.6.1). Ein großer Vorteil des Konzepts liegt darin begründet, dass aus den spektralen Eigenschaften des Laurdan (**24**) Aussagen über die Dynamik der Umwandlungen zwischen verschiedenen „Zuständen“ getroffen werden können. Die Hauptanwendungsgebiete für Laurdan liegen heute in der Untersuchung von Modellmembranen und der Membranen lebender Zellen. In den ersten Bereich fallen besonders Untersuchungen, in denen der Einfluss bestimmter Zusätze auf die Modellmembranen bestimmt wird, wie z.B. der Einfluss von Cholesterol (**11**)^[36-40], Alkoholen^[41] und Ionen^[42]. Untersuchungen an Zellmembranen lebender Zellen wurden u.a. an Erythrozyten^[43], Spermatozoen^[44] und Neuronen^[45,46] durchgeführt. Praktische Verwendung findet Laurdan (**24**) heute in der Temperaturmessung von Zellen und bei der Qualitätsbestimmung von Blutkonserven.

1.3 Membranproteine und natürliche Signaltransduktion

Biologische Membrane, aufgebaut aus einer Lipiddoppelschicht-Matrix, enthalten mit dieser assoziierte Proteine. Die Zusammensetzung der Lipidfraktion ist äußerst komplex und abhängig von der Herkunft der Membran. Die Membran von *E. Coli*-Bakterien besteht ausschließlich aus Phosphatidylcholinen und Cardiolipin, wobei die Membran der menschlichen Erythrocyten und des Myelins eine deutlich komplexere Lipidmischung aufweist. Im Myelin ist der Anteil an Glycolipiden fast zweieinhalb Mal so hoch, dafür der Anteil an Sphingomyelin (**22**) nur halb so groß wie in den Erythrocyten. Die Membranproteine übernehmen membrangebundene Prozesse und sind, je nach Herkunft ihrer Funktion, nur auf spezielle Membrane verteilt. Obwohl das Lipid/Protein-Verhältnis je nach Funktion der Zelle stark variieren kann, besitzen die meisten Membranen einen Proteingehalt von rund 50 %.^[1,8,47]

Die Klassifizierung von Membranproteinen erfolgt operational; d.h. nach Stärke der Protein-Membranbindung. Unterschieden werden die Peripherie- oder Oberflächenproteine und die integralen oder intrinsischen Proteine (Abbildung 27). Oberflächenproteine sind relativ schonend von der Membran abzulösen, beispielsweise durch Einstellen einer hohen Salzkonzentration, durch Zugabe von Chelatbildnern oder einer pH-Wert-Änderung. Die Biomembran bleibt dabei intakt. Das zu dieser Kategorie gehörende Cytochrom C ist in wässriger Lösung stabil und bindet selbst keine Lipidmoleküle. Die Bindung an die Oberfläche erfolgt wahrscheinlich über Proteine, die integral in der Membran verankert sind, über Wasserstoffbrückenbindungen oder elektrostatische Wechselwirkungen.^[47] Die integral-

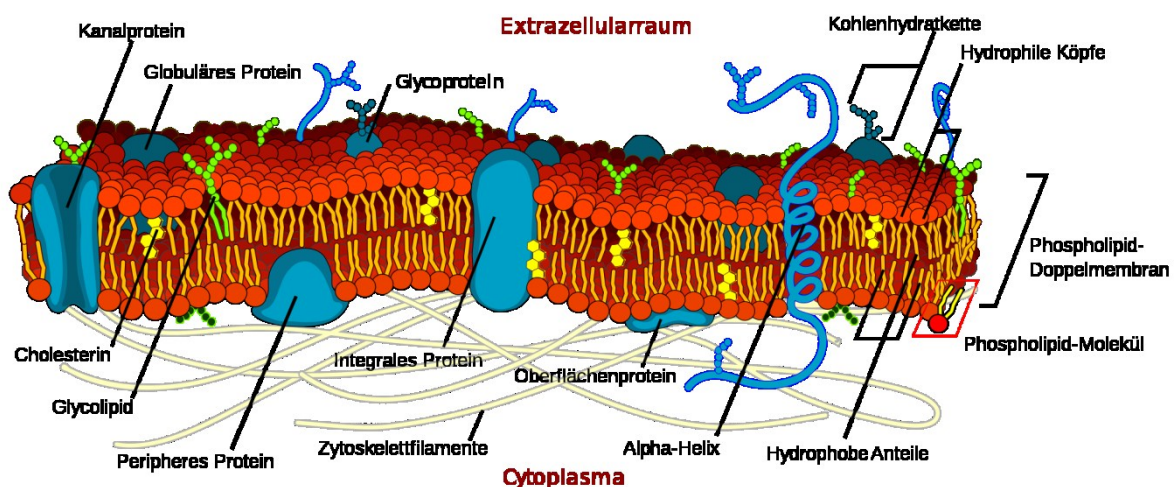


Abbildung 27: Schematische Abbildung einer Plasmamembran.^[11]

en Proteine sind durch hydrophobe Wechselwirkungen fest in der Membran verankert. Ihr Herauslösen aus der Lipiddoppelschicht ist nur mit Hilfe von membranzerstörenden Substanzen wie unpolaren Lösungsmitteln und Detergenzien möglich. Untereinander aggregieren oder präzipitieren sie leicht und sind häufig nur unter denaturierenden Bedingungen von den umgebenden Lipiden zu trennen. Integrale Proteine können durch Oberflächenmarkierung, beispielsweise durch gezieltes Fluoreszenzlabeling sichtbar gemacht werden. Durch dieses Verfahren kann gezeigt werden, ob die Proteine nur zu einer Seite der Membran hin exponiert, direkt an der Oberfläche gebunden sind oder zur Unterkategorie der Transmembranproteine gehören (Abbildung 27). Integrale Proteine sind amphiphil. Die Proteinabschnitte im unpolaren Inneren der Membran haben vorwiegend unpolare Oberflächenstrukturen. Die Anteile, die mit dem wässrigen Medium in Kontakt treten, weisen vorwiegend polare Reste in ihrer Peripherie auf. Spezifische integrale Proteine sind konstant zu einer Oberfläche der Membran hin orientiert. Die Transmembranproteine weisen eine feste und gerichtete Einlagerung auf. Eingelagerte Proteine sind in der Plasmamembran statistisch verteilt und können durch das Fluid-Mosaik-Modell beschrieben werden.^[48] Die, bei künstli-

chen Lipiddoppelschichten nachgewiesene Fluidität lässt auch bei biologischen Membranen ähnliche Eigenschaften vermuten. Die Vorstellung, dass sich die Membranproteine wie „Eisberge“ in einem zweidimensionalen „Lipidmeer“ durch laterale Diffusion bewegen, wurde 1972 von *Singer* und *Nicholson* in ihrer Theorie zur Membranstruktur als Fluid-Mosaik-Modell verfasst und konnte durch verschiedene Ansätze experimentell bestätigt werden.^[49,50] Die Verteilung der Membranproteine und Membranlipide in der Biomembran ist des Weiteren asymmetrisch, d.h. das innere und das äußere Blatt der Doppelschicht weisen eine unterschiedliche Zusammensetzung auf. Somit ist gewährleistet, dass jede Schicht, für sich genommen, eine ausreichende Beweglichkeit besitzt. Proteine, die je nach ihrer Funktion in der inneren oder äußeren Hemisphäre der Membran eingelagert sind, sind, wie jede Zelle in einem mehrzelligen Lebewesen, während der Evolution so programmiert worden, dass sie auf spezifische extrazelluläre Signale, induziert von Zellen in ihrer Umgebung, antworten können. Die verschiedenen Wege der biochemischen Kommunikation wurden bereits in Kapitel 1.1 (Biochemische Kommunikation) erläutert. Die Zellsignalisierung macht nicht nur extrazelluläre Signalmoleküle unabkömmlich, sondern erfordert komplementäre Gruppen von Rezeptoren, die Membranproteine, die der Zelle die Möglichkeit bieten, Botenstoffe auf spezifische Weise zu binden und ihre Signale zu beantworten. Da die meisten extrazellulären *messenger*, mit Ausnahme einiger Steroid- und Thyroidhormone, hydrophil sind und die biologische Doppelmembran nicht passieren können, können sie die Rezeptorproteine nur an der Oberfläche der Zielzelle aktivieren. Die membrangebundenen Rezeptorproteine wirken hierbei als Signalwandler, indem sie die extrazelluläre Bindung eines Liganden in intrazelluläre Signale wandeln. Es gibt drei Hauptgruppen von Zelloberflächen-Rezeptoren, von denen jedem zu Eigen ist, dass die Signalumformung in charakteristischer Weise erfolgt. Ionenkanal-gekoppelte Rezeptoren (Abbildung 28) sind für bestimmte Ionen (K^+ , Na^+ , H^+ , Ca^{2+} , etc.) permeable Kanäle, die neurotransmitterabhängig sind und sich durch ein spezi-

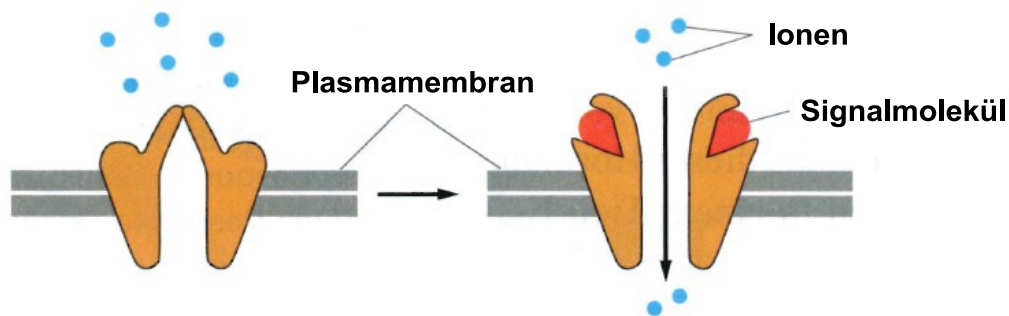


Abbildung 28: Schematische Darstellung eines Ionenkanals.^[47]

fisches Bindungsereignis öffnen oder schließen. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR's) aktivieren oder inaktivieren auf indirektem Weg an die Plasmamembran gebundene Enzyme oder Ionenkanäle über trimere GTP-Bindungsproteine (G-Proteine) (Abbildung 29). Als dritte Gruppe treten die Enzym-gekoppelten Rezeptoren in Erscheinung (Abbildung 30). Sie sind entweder direkt als Enzym wirksam oder mit Enzymen, gewöhnlicherweise Protein-kinasen, die zur gezielten Phosphorylierung befähigt sind, assoziiert. Auf die Gruppen der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und der Enzym-gekoppelten Rezeptoren soll in den Kapiteln 1.4 (β -adrenerge Rezeptoren) und 1.5 (Rezeptor-Tyrosinkinasen) an konkreten Beispielen noch näher eingegangen werden. Die meisten aktivierten Zelloberflächen-Rezep-

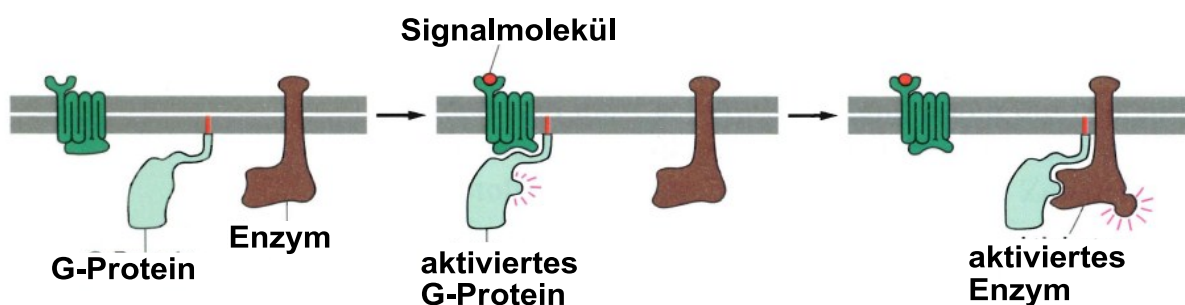


Abbildung 29: Schematische Darstellung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren.^[47]

toren übertragen Signale mittels kleiner Moleküle und einem Netzwerk aus intrazellulären Signalproteinen (Abbildung 31). Diese Kaskade intrazellulärer Ereignisse verändert Zielproteine innerhalb der Zelle, die schlussendlich für die Modifizierung des Zellverhaltens verantwortlich sind. Die intrazellulären Mediatoren werden auch *second messenger* genannt.

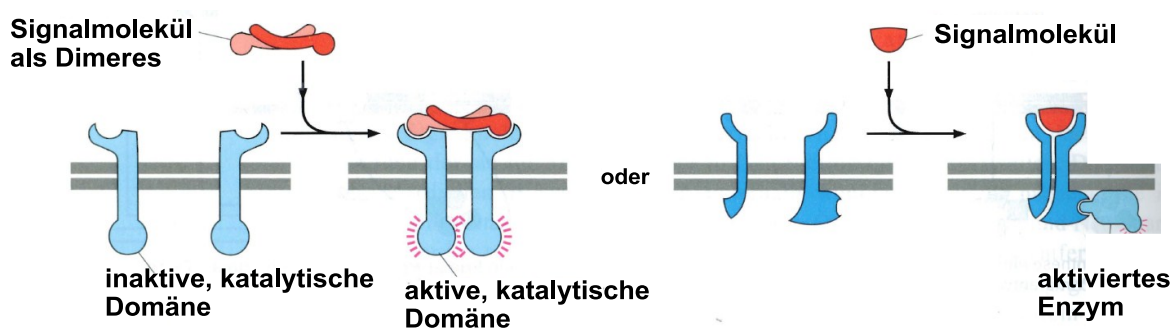


Abbildung 30: Schematische Darstellung Enzym-gekoppelter Rezeptoren.^[47]

Die *second messenger* werden in großer Menge als Antwort auf die Rezeptoraktivierung ausgeschüttet. Die diffusionskontrollierte Entfernung der *second messenger* vom Ort der Ausschüttung verbreitet das Signal in andere Zellbereiche. Einige Mediatoren (cAMP, Ca^{2+}) diffundieren in das Cytosol, andere (z.B. Diacylglycerin), die lipidlöslich sind, in die Ebene der Plasmamembran. In beiden Fällen wird das Mediatorsignal durch Bindung an Signal- oder

Zielproteine weitergegeben und verändert deren Verhalten. Die großen Signalproteine leiten den Impuls in das Zellinnere weiter und aktivieren das nächste Signalprotein oder stimulieren die Ausschüttung weiterer Botenstoffe. Die an der Signalkaskade beteiligten Proteine werden dabei in verschiedene Kategorien eingeordnet (Abbildung 31):

1. Übertragungsproteine fungieren als Weiterleitungsspezies für das empfangene Signal.
 2. Botenstoffproteine treten als Signalüberträger innerhalb der Zelle auf und leiten das Signal von einem Zellbereich in einen anderen (z.B. vom Cytosol in den Zellkern).
 3. Verbindungsproteine dienen zur Kopplung zweier Signalproteine, ohne selbst ein Signal zu befördern.
 4. Verstärkerproteine sind für gewöhnlich Enzyme oder Ionenkanäle und stellen große Mengen intrazellulärer Mediatoren zur Verfügung (Signalkaskade bei mehrstufiger Ausschüttung).
 5. Umformerproteine wandeln das eingehende Signal und verstärken es gleichzeitig (z.B. das cAMP-bildende Protein).
 6. Gabelungsproteine spalten das Signal auf und eröffnen weitere modifizierte Signalwege.
 7. Integratorproteine sind in der Lage verschiedene Signalwege zu bündeln und das Signal gerichtet weiterzuleiten.
 8. Verborgene Genregulatorproteine diffundieren nach Aktivierung der Oberflächenrezeptoren in den Zellkern und stimulieren die Gentranskription.
-

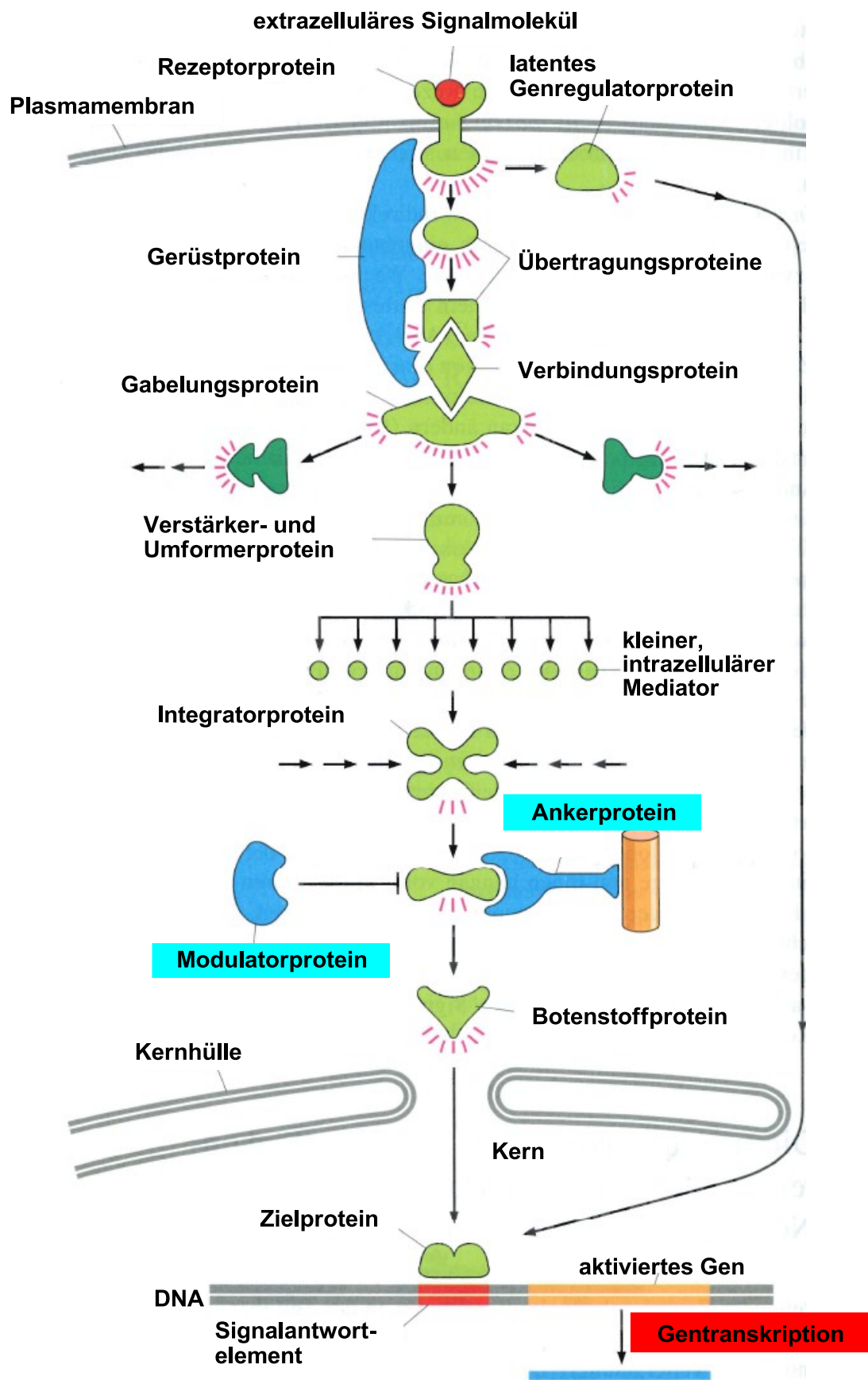


Abbildung 31: Mögliche Signaltransduktionswege, induziert durch ein Transmembranprotein.^[47]

1.4 β -adrenerge Rezeptoren

Die bei Stresssituationen aktiven adrenergen Rezeptoren gehören zur Familie der GPCR's (G-Protein-gekoppelte Rezeptoren). Bei Stress werden die Neurotransmitter Adrenalin (10) und Noradrenalin (9) aus dem Nebennierenmark ausgeschüttet. Noradrenalin (9) und Adrenalin (10) konnten 1900 durch *T. B. Aldrich* und *T. Takamine* in reiner Form isoliert werden.^[51] Außerdem konnte Adrenalin (10) als erstes biogenes Amin, ausgehend von Catechol, totalsynthetisch in Form eines Racemats hergestellt werden.^[51] Die Biosynthese, der in Abbildung 32 dargestellten Catecholamine Dopamin (27), Adrenalin (10) und Noradrenalin (9) verläuft enzymkatalysiert aus *L*-Phenylalanin (25).

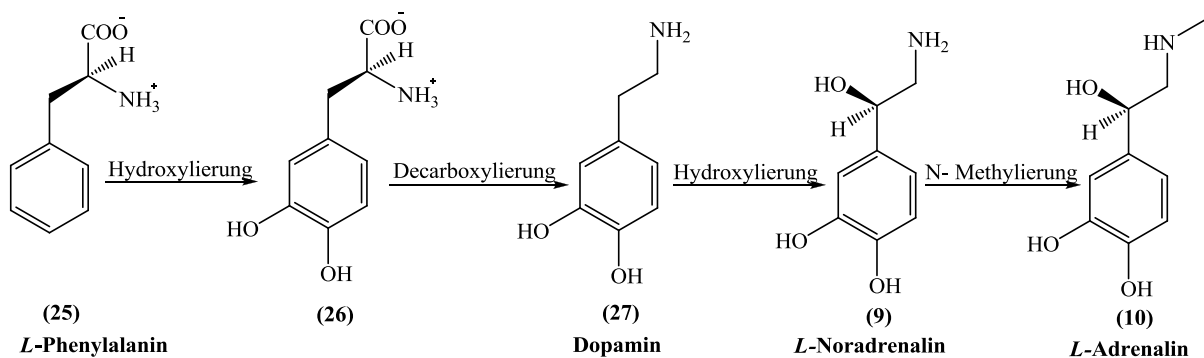


Abbildung 32: Lewisäure-Strukturen und Biosynthese von Dopamin (27), *L*-Noradrenalin (9) und *L*-Adrenalin (10).

Der heutige Kenntnisstand über die Wirkmechanismen des biogenen Catecholamins Adrenalin (10) ist größtenteils Arbeiten von *E. Sutherland* zu verdanken, für die er 1971 den Nobelpreis in Medizin erhielt.^[52-55] Nach Freisetzung des Neurotransmitters Adrenalin (10) aus den Nebennierenmark, dockt dieser an die β -adrenergen Rezeptoren an. Diese befinden sich vorwiegend in den Hepatocyten (Leberzellen) und den Myocyten (Muskelzellen).

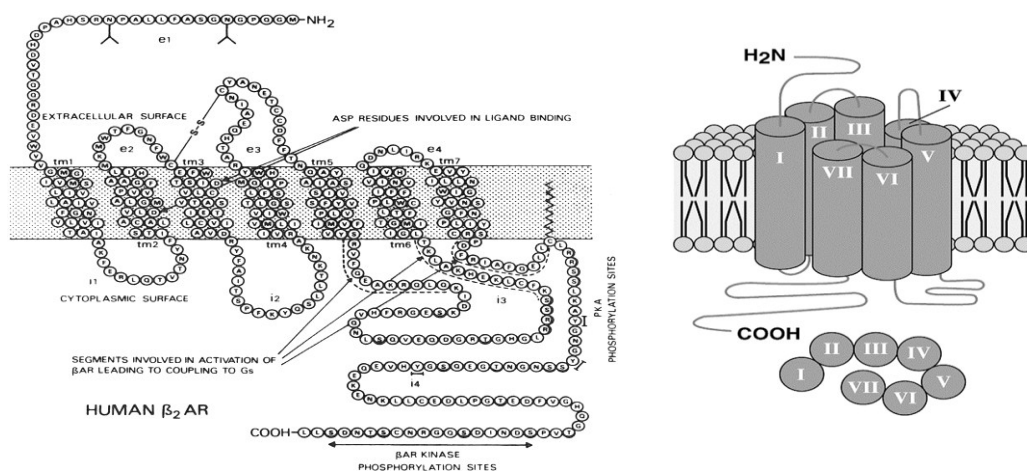


Abbildung 33: Snake-Diagramm und schematische Darstellung des β_2 -adrenergen Rezeptors.^[56]

Die adrenergen Rezeptoren besitzen den in Kapitel 1.3 (Membranproteine und natürliche Signaltransduktion) beschriebenen, charakteristischen Aufbau. In Abbildung 33 sind das Snake-Diagramm und ein schematisches Modell des β_2 -adrenergen Rezeptors dargestellt.^[56] Die Bindungstasche für das Adrenalin (**10**) bilden die transmembranen α -Helices (TM1-7) im Inneren der hydrophoben Domänen.^[57-59] Dem Asp¹¹³ im TM3 kommt bei der Erkennung des Adrenalins (**10**) eine besondere Bedeutung zu. Die Ammoniumfunktion des Adrenalins (**10**) wird durch die freie Carboxylat-Funktion der Asparaginsäure komplexiert. An der Komplexierung der Hydroxyfunktion sind verschiedene Asparagin- und Serinreste beteiligt. Eine weitere Verstärkung der Komplexbindung kommt durch *face*-

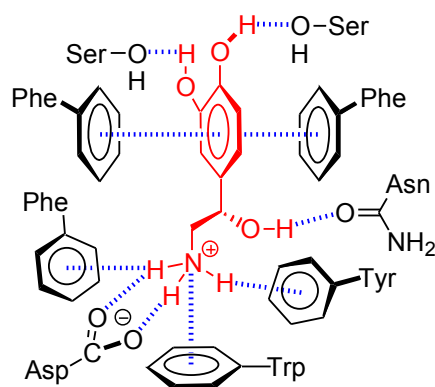


Abbildung 34: Schematische Darstellung der bindenden Wechselwirkungen im (Nor)-Adrenalin-Rezeptor-Komplex.

to-face- π - π - und π -Kationenwechselwirkung zustande (Abbildung 34). Im Folgenden soll der Ablauf der Signaltransduktion am β_2 -adrenergen Rezeptor beschrieben werden (Abbildung 35, 36):

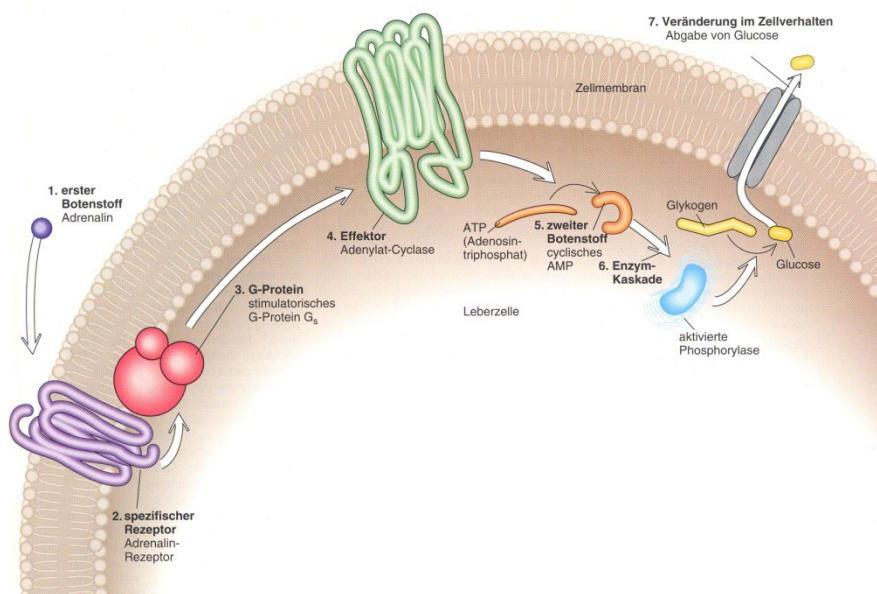


Abbildung 35: Schematische Darstellung der Signaltransduktionssequenz am β_2 -adrenergen GPCR.^[1]

Der Neurotransmitter Adrenalin (**10**) bindet an den stimulierenden Rezeptor (R_S), wodurch sich dessen Konformation ändert. Diese Änderung der Konformation wird auf das cytosolisch, an den Rezeptor gebundene, G-Protein übertragen (Abbildung 36). Der, aus

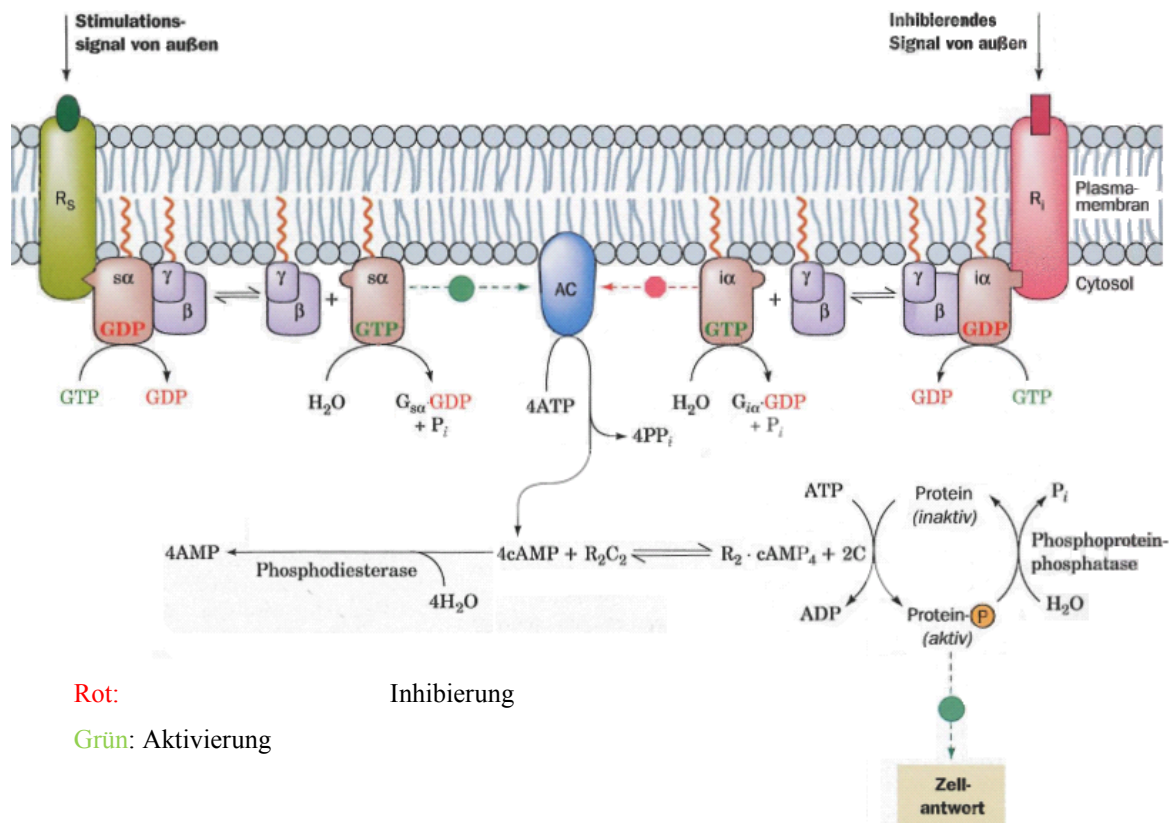


Abbildung 36: Signaltransduktion der adrenergen Rezeptoren/Wirkung auf das Adenylatzyklase-System.^[1]

drei Untereinheiten (α , β und γ) aufgebaute G-Protein-Komplex, dissoziiert. Damit verbunden ist eine Abschwächung der Affinität der α -Untereinheit gegenüber GDP. Der Austausch gegen ein GTP wird begünstigt. Das GTP-aktivierte G-Protein (α) stimuliert nun die Adenylatzyklase (AC) zur Umsetzung von ATP in cAMP. Dieses dient als sekundärer Botenstoff im Cytosol, indem die cAMP-abhängige Proteinkinase A (R_2C_2) durch Abspaltung der katalytischen Untereinheit (C) aktiviert wird. Im Folgenden können verschiedene zelluläre Proteine durch Phosphorylierung aktiviert werden. Beispielsweise bewirkt die Enzymkaskade eine Aktivierung der Glycogen-Phosphorylase, die den Abbau von Glycogen zu Glucose-1-Phosphat katalysiert. Das freigesetzte Glucose-1-Phosphat dient im Gefahrenfall als schneller Energielieferant für die Muskelzellen. Somit werden, induziert durch das Adrenalin (**10**), die Glycogenolyse und Glyconeogenese in der Leber, die Lipolyse im Fettgewebe, die Relaxation der glatten Bronchialmuskulatur, die Relaxation der Blutgefäße der Skelettmuskulatur und die Aktivität des Herzmuskels stimuliert.^[9] Dabei wird an das inhibierende G-Protein ein sekundärer Botenstoff gebunden. Die α -Untereinheit ($i\alpha$) ist von der des stimulierenden G-Proteins verschieden. Dementsprechend wird durch die GTP-aktivierte Untereinheit $i\alpha$

die Adeninyklase (AC) inhibiert. Die resultierende Zellantwort hängt daher vom Zusammenspiel von Stimulierung und Inhibierung verschiedener Rezeptoren ab, da deren Signaltransduktionswege gekoppelt sind. Nach vorsichtigen Schätzungen induziert ein gebundenes Adrenalinmolekül die Freisetzung von 10.000 Glucosemolekülen.^[60] Somit induziert die Signaltransduktionskaskade nicht nur eine schnelle Signalweiterleitung, sondern zugleich eine Signalverstärkung. Dieser Sachverhalt verdeutlicht, dass die pathologisch unbedenkliche Adrenalinkonzentration im Blut sehr gering ist. Sie liegt im nanomolaren Bereich.

1.5 Rezeptor-Tyrosinkinasen

Die Rezeptor-Tyrosinkinasen gehören zu einer von insgesamt fünf Klassen von Enzym-gekoppelten Rezeptoren. Sie sind neben den Tyrosinkinase-assoziierten-Rezeptoren am zahlreichsten vertreten. Sie lassen sich in sieben weitere Unterfamilien unterteilen (Abbildung 37), die unterschiedlichste Aufgaben in der Zelle übernehmen.

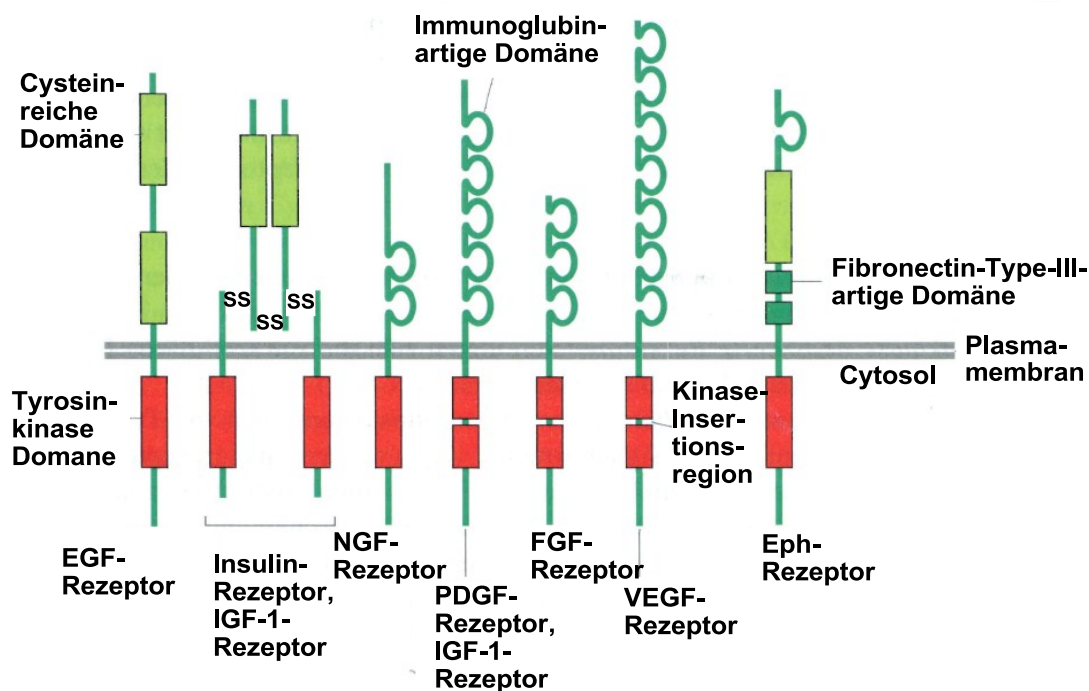


Abbildung 37: Sieben Unterfamilien von Rezeptor-Tyrosinkinasen.^[47]

Tabelle 1 zeigt einige Signalproteine, die über Rezeptor-Tyrosinkinasen wirken. Die Rezeptoren für Ephrine, Eph-Rezeptoren genannt, sind die zahlreichsten Rezeptor-Tyrosin-Kinasen. Sie zeigen ein ungewöhnliches Verhalten. Sie fungieren in gleicher Weise als Ligand und Rezeptor. Beim Binden an einen Eph-Rezeptor aktivieren die Ephrine den Rezeptor und werden selbst aktiviert, um Signale in das Innere der Ephrin expremierenden Zelle

Tabelle 1: Einige Signalproteine, die über Rezeptor-Tyrosinkinasen wirken.^[1,8,12,60,61]

Signalisierender Ligand	Rezeptoren	Antwort
Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)	EGF-Rezeptor	stimuliert Proliferation verschiedener Zelltypen
Insulin/-artige Wachstumsfaktoren (IGF-1 und IGF-2)	Insulin-Rezeptor/ IGF-Rezeptor-1	stimuliert Kohlenhydratverwertung und Proteinsynthese/ Zellwachstum
Nerven-Wachstumsfaktor (NGF)	Trk A	stimuliert Zellwachstum- und überleben
Blutplättchen abgeleitete Wachstumsfaktoren (PDGF AA, BB, AB)	PDGF-Rezeptoren	stimuliert Überleben und Wachstum von Zellen
Makrophagenkolonie stimulierender Faktor (M-CSF)	M-CSF-Faktor	stimuliert Monocyten/Makrophagen-Proliferanten
Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (FGF-1 bis FGF-24)	FGF-Rezeptoren (FGF-R1-FGF-R4 plus mehrerer Isomeren von jedem)	stimuliert Proliferanten verschiedener Zelltypen; induktive Signale in der Entwicklung

zu übertragen. Dieses Verhalten führt zu einer reziproken, in beide Richtungen verlaufenden Signalleitung, die das Verhalten beider Zellen ändert. Eine solche bidirektionale Signalisierung ist zum Beispiel erforderlich, um Zellen in besonderen Bereichen des sich entwickelnden Gehirns davon abzuhalten, sich mit Nachbarzellen zu vermischen. Die Bindung eines extrazellulären Botenstoffs aktiviert die Kinasedomänen. Die Ligandenbindung an Rezeptor-Tyrosinkinasen veranlasst die Rezeptoren, zwei oder mehrere Rezeptorketten in der cytoplasmatischen Domäne zusammenzubringen und ein Dimer oder höheres Oligomer zu bilden. In einigen Fällen verursacht die Bindung des primären Botenstoffs die Bildung von Oligomeren. In anderen Fällen erfolgt die Oligomerisierung vor der Bindung des Liganden. Der Ligand induziert eine Umorientierung der Rezeptorketten.

In allen erwähnten Fällen startet die in den cytosolischen Kettenenden erfolgte Umstellung der Rezeptoren die intrazelluläre Signalweiterleitung. Die benachbarten Kinasedo-

mänen werden befähigt, die Mehrfach-Tyrosine über Kreuz zu phosphorylieren. Dieser Vorgang wird auch Autophosphorylierung genannt (Abbildung 38). Die Autophosphorylierung

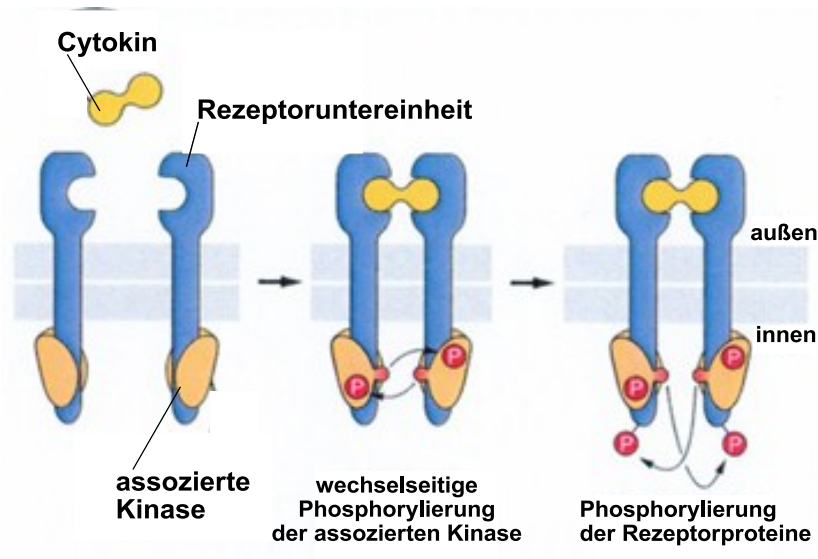


Abbildung 38: Funktionsweise der Rezeptortyrosinkinasen I.^[8]

wiederum aktiviert die Kinasen, die im Folgenden befähigt sind, die Rezeptorproteine zu phosphorylieren oder einen Satz Phosphatotyrosine zu bilden, die als Andockstellen für intrazelluläre Signalproteine dienen (Abbildung 39).

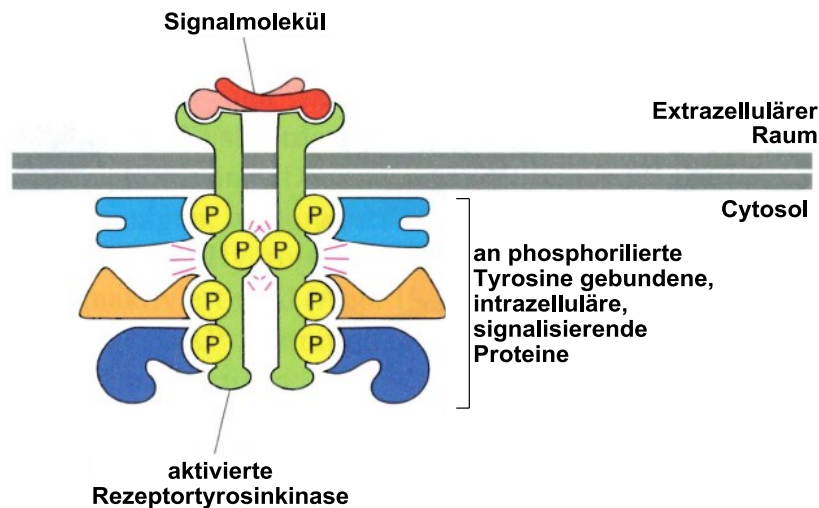


Abbildung 39: Funktionsweise der Rezeptortyrosinkinasen II.^[47]

Die fortdauernde Aufrechterhaltung der Trennung von cytosolischem und extrazellulärem Medium unter Vermeidung von physikalischem Stofftransport hat große Vorteile für die Zelle, da potentiell zytotoxische Neurotransmitter ausgeschlossen werden.

1.6 Künstliche Signaltransduktionssysteme

Wie in den vorherigen Kapiteln dargestellt, ist die Signalleitung ein natürlicher Prozess von fundamentaler Bedeutung, bei der, ein auf die Zelle wirkender extrazellulärer Reiz, eine funktionelle Antwort innerhalb der Zelle stimuliert.^[61,62] Dieser Vorgang, der typischerweise durch Hormon- oder Neurotransmitter-Rezeptor-Wechselwirkungen an der Oberfläche der Zelle initiiert wird, bedingt entweder eine konformationelle oder kinetische Änderung der membrandurchspannenden Transmittereinheit. Aus diesem Ereignis resultiert direkt die Freisetzung eines sekundären Botenstoffs, wie z.B. im Falle des β_2 -adrenergen Rezeptors und der Rezeptortyrosinkinasen von zyklischem Adenosin-Mono-Phosphat (cAMP), oder, z.B., von Calcium-Ionen. Trotz der eminenten Bedeutung der natürlichen Signaltransduktion, gibt es nur wenige künstliche Signaltransduktionssysteme.

In einigen wenigen Beispielen wurden photochemische Schalter mit Peptiden kombiniert^[63,64] oder Dekalinsysteme^[65] synthetisiert, die beeindruckende schaltbare konformationelle Änderungen aufweisen. Als molekulare Schalter bezeichnet man Moleküle, die auf einen externen Stimulus hin reversibel zwischen zwei oder mehreren Zuständen wechseln können (An, Aus).^[66-68] Man unterscheidet im Allgemeinen Photoschalter/chiroptische Schalter^[69,70], Redox-Schalter^[71-73], schaltbare Rotaxane und Catenane^[74-76], sowie schaltbare allosterische Rezeptoren.^[77,78] Konformationsschalter weisen ein bikonformatives Grundgerüst auf. Die reversible Photo-Kontrolle von Proteinstrukturen und -funktionen kann mittels Photoisomerisierungen erreicht werden. Retinale Chromophore in Rhodopsinen, lineare Tetrapyrrole in Phytochromen und *p*-Hydroxycinnaminsäuren sind natürlich auftretende photoisomerisierbare Gruppen in photosensitiven Proteinen.^[79,80] In künstlichen Systemen sind Azabenzol-basierende Systeme neben Aminosäurederivaten der Azabenzole am Weitesten verbreitet.^[81-83]

Von Wooley *et al.* wurden Hemithioindigo-basierte photoisomerisierbare Gruppen via Festphasensynthese in den peptidischen Ionenkanal Gramicidin eingebaut. Ein großer Vorteil der Hemithioindigo-Switches liegt in der hohen Robustheit, der hohen Anzahl an möglichen Schaltzyklen, einer deutlich erhöhten End-zu-End-Länge und einem, sich signifikant ändernden, Dipolmoment.^[84-89] Abbildung 40 zeigt die *cis/trans*-Isomere **28a/b** und die sich ändernden Dipolmomente der verwendeten photochemisch schaltbaren Gruppen. Die Anknüpfung an Position 1 der Gramicidin-Ionenkanäle sind den Modelling-Bildern in Abbildung 40 zu entnehmen. Die selektive photoinduzierte *E/Z*-Isomerisierung der Hemithioindigo-Kopfgruppen beeinflusst sowohl die Stärke des Ionenflusses als auch die Verweilzeit der Ionen in dem Kanal. Durch die sich stark ändernden Dipolmomente (Abbildung 40) wird ein

positives Dipolmoment im Z-Isomer **28b** in Richtung des Kationenflusses induziert. Dieses bedingt, dass der Ionenfluss gesenkt wird. Die Kontrolle der zentralen Barriere für die Unterscheidung zwischen Natrium- und Cäsiumkationen ist ebenfalls möglich.^[64]

Ein weiteres System von *Wooley et al.* zeigt eindrucksvoll den Funktions-/Struktur-Zusammenhang, der sich mit Hilfe von Azabenzol-Photoschaltern bewerkstelligen lässt.^[63] Die Synthese und das Design von Azabenzol-funktionalisierten künstlichen Peptiden eröff-

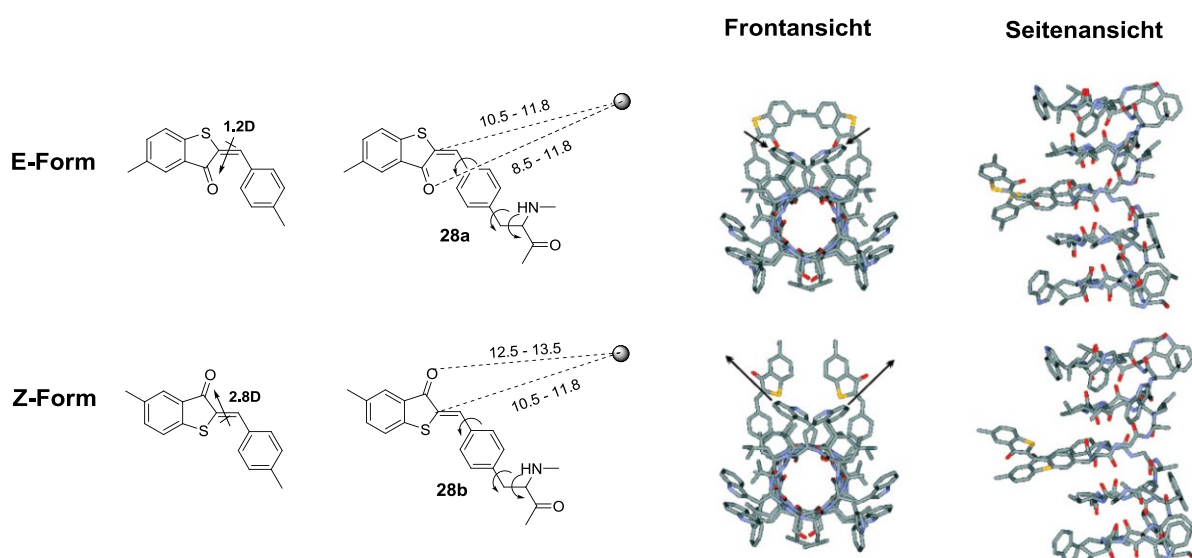


Abbildung 40: Dipolmomente von Hemithioindigo-Seitenketten und Hemithioindigo-Aminosäuren; Modelling von Dimeren Gramicidin A Kanälen mit Hemithioindigoaminosäure 28 an Position 1.^[64]

nete das Feld der photochemisch-kontrollierbaren Schaltung von α -Helices. Die Verknüpfung eines FK-11-Peptids mit einem Azabenzol-Crosslinker an den Cysteinresten 1 und 11 lieferte ein Modelpeptid **29**, das über die photochemisch-induzierbare *cis/trans*-Isomerie des Azabenzollinkers **30** von der α -helikalen- in die ungefaltete Struktur überführt werden kann.

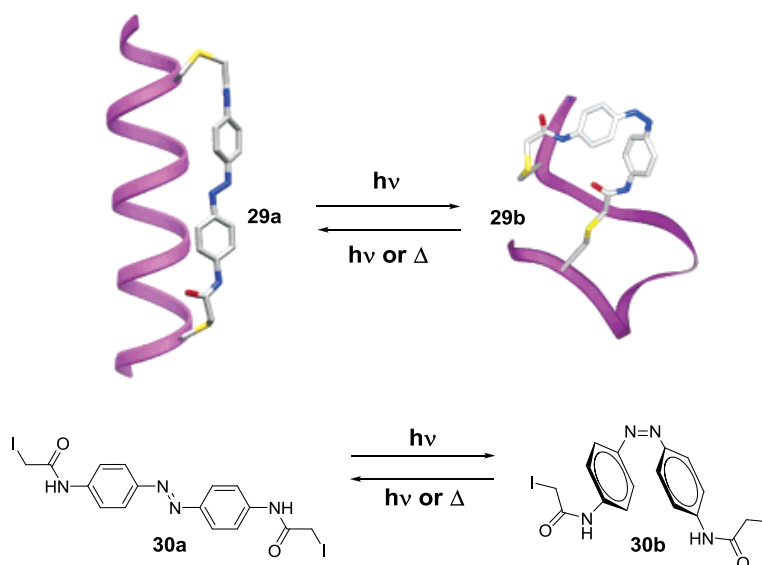


Abbildung 41: Photoisomerisierung des Azolinkers 30 induziert helikale Struktur des Peptids 29.^[63]

Die temperaturinduzierte- oder wiederholte Photoisomerisierung der *cis*- in die *trans*-Form führt zur Rückfaltung in die ursprüngliche helikale Struktur (Abbildung 41). Können diese Ergebnisse in Zukunft auf komplexere Systeme oder gar auf natürliche Proteine übertragen werden, steht ein Werkzeug zur Verfügung, mit dem intrinsische Konformationsänderungen induziert und somit auch die biologische Aktivität beeinflusst und geschaltet werden kann.

Bikonformative *cis*-Decaline^[91-94] und *cis*, *anti*, *cis*-Perhydroanthracene^[95-97] haben sich bereits als Schaltelemente zur molekularen Signaltransduktion durch konformative Transmission bewährt. ^[98-103] Koert *et al.* synthetisierten einen Konformationsschalter **31**, der in der Lage ist, größere Distanzen zu überbrücken, wie es für die Signalleitung über eine biologische Membran notwendig ist. Hierzu wurden zwei *cis*-Decalinsysteme über ein 14-gliedriges Bislactam verknüpft (Abbildung 42). Ein Doppelringflip der „linken“ Decalineinheit von **31** induziert über das Bislactam hinweg einen Doppelringflip in der „rechten“ Decalineinheit. Um diesen Konformationswechsel einzuleiten, wurde die kovalente Bisacetatklammer mit-

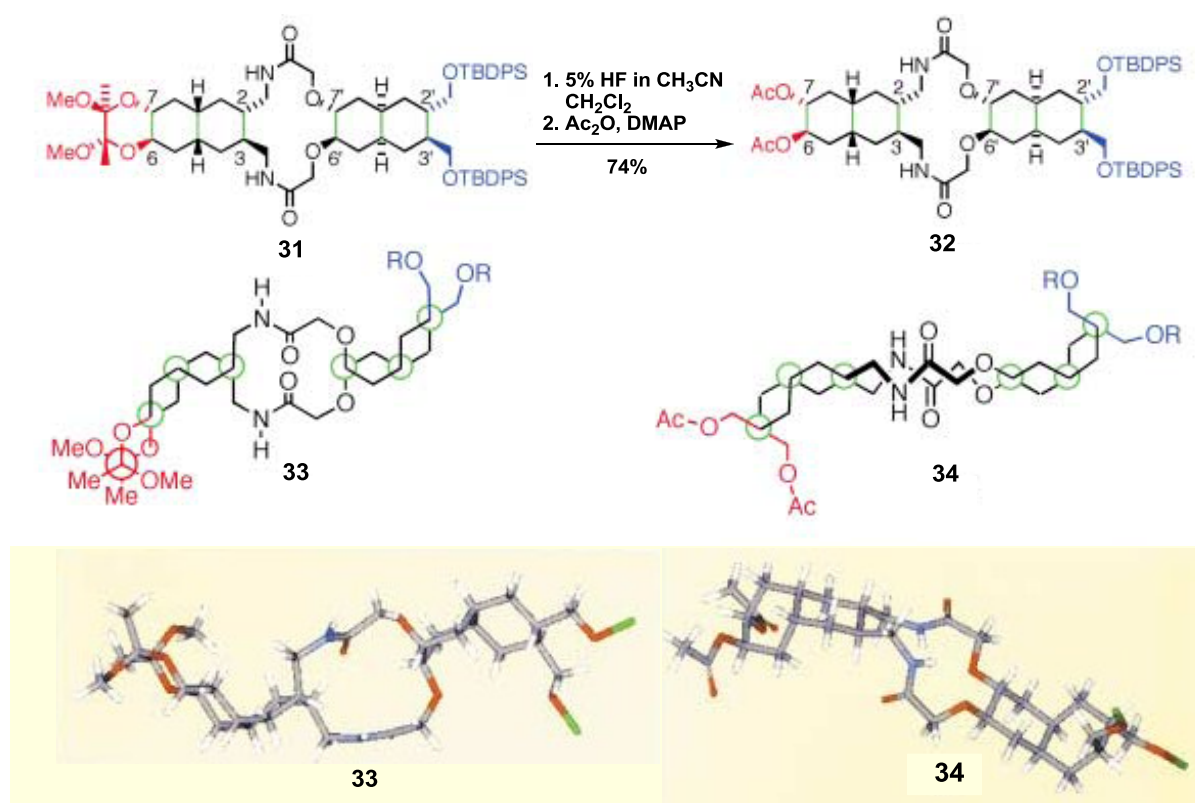


Abbildung 42: Konformationsschalter **31** nach Koert *et al.*^[65]

tels Flusssäure gespalten. Das resultierende Diol wurde als Diacetat **32** geschützt, um die NMR-Analysen zu erleichtern. In der „linken“ Dekalineinheit wechseln die beiden Sauerstoffs substituenten von der äquatorialen in die axiale Position. Der induzierte Doppelringflip bringt die beiden Substituenten an C2 und C3 in eine äquatoriale Anordnung. Über den Bislactamring hinweg führt der Konformationswechsel im „linken“ Decalinsystem zu dem

beschriebenen Doppelringflip in der „rechten“ Dekalineinheit. In diesem wechseln die Substituenten an C6' und C7' von der axialen in die äquatoriale Position und die vormals äquatorial angeordneten Substituenten an C2' und C3' in die axiale. Abbildung 42 (unten) zeigt die geänderte Konformation des Schalters **33** bzw. **34**. Die Schaltdistanz vom linken zum rechten Molekülende beträgt etwa 1.5 nm. Wenn über diese Methode drei Decaline über zwei Bis lactamklammern verknüpft werden, wäre es möglich, den lipophilen Bereich einer Phospholipid-Doppelschicht zu überbrücken.^[20] Allerdings wurden nur wenige dieser eleganten Systeme in biologische Membrane eingebaut. In diesem Zusammenhang sind einige synthetische Ionenkanäle zu nennen, die Liganden-induziert geöffnet oder geschlossen werden können und erfolgreich in Modellmembranen eingelagert wurden.^[104,105]

Supramolekulare π -Stapel-Wechselwirkungen sind mit die fundamentalsten Wechselwirkungen in der DNA-Chemie, in biologischen Ionenkanälen aber nicht anzutreffen, und wurden bisher auch nicht im rationalen Design von synthetischen Ionenkanälen berücksichtigt. Bisherige Arbeiten auf diesem Gebiet lieferten fast ausschließlich unifunktionale Systeme.^[106] Das Bestreben zur Synthese künstlicher Ionenkanäle geht immer mehr in die Richtung eines „smarten“ Designs mit definierten multiplen Funktionen.^[106-117] Erste Durchbrüche zur Erkennung von komplexen Ionen^[115] und spezifischen Charakteristika, wie die Polarisation von Membranen^[109] wurden gefolgt von ausgezeichneten Studien über Ionen- und

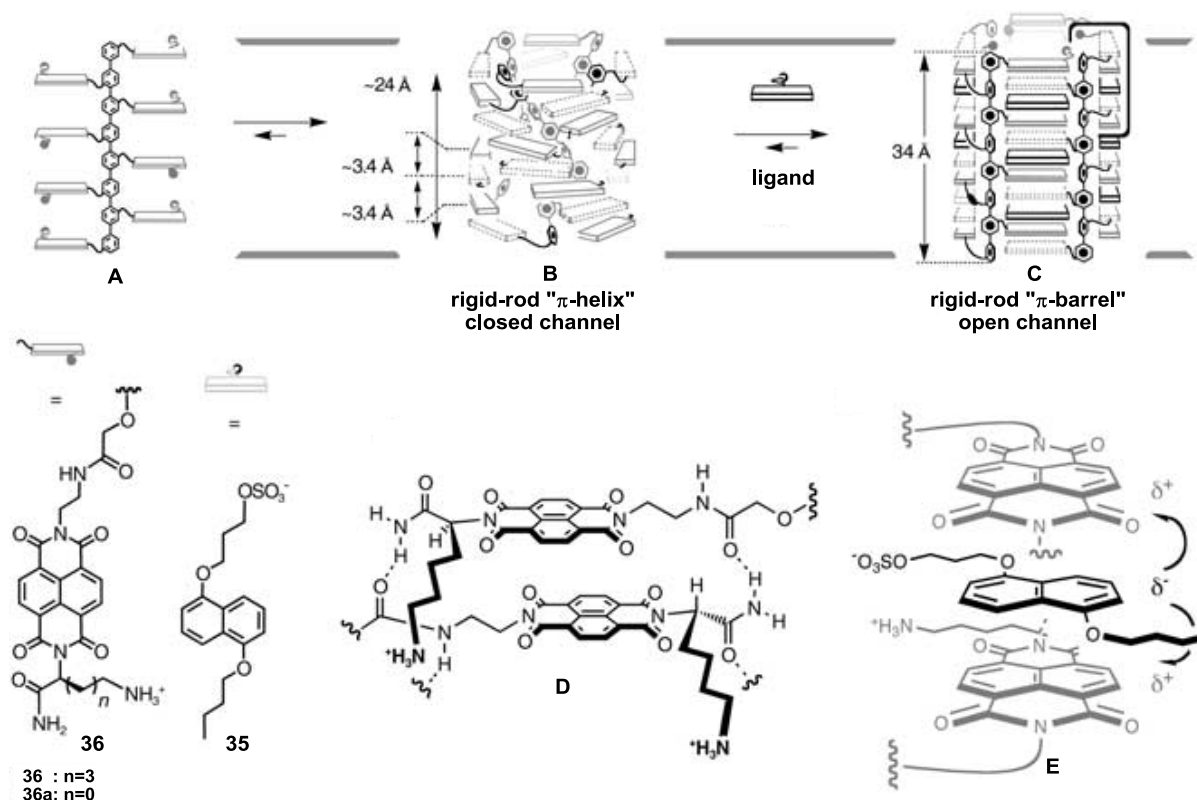


Abbildung 43: Liganden-induziertes Öffnen eines Ionenkanals.^[104]

Membranselektivitäten. Die Kombinationen von Erkennung^[112] und Transformation^[107] führte zu synthetischen multifunktionalen Poren, die praktische Anwendung auf den Gebieten des „molecular Sensing“^[108,110] und der Katalyse^[111,113,114] erlangten.

Matile et al. entwickelten einen synthetischen Ionenkanal, der auf π -Stapel-Wechselwirkungen nach dem Vorbild der DNA basiert (Abbildung 43).^[104] Zum Aufbau dieses Systems wurden Dialkoxynaphthaline **36** (DAN) und Naphthalindiimide **35** (NDI) verwendet. Diese beiden aromatischen Systeme bilden einen violetten Charge-Transfer-(CT)-Komplex, in dem das DAN als Donor und das NDI als Akzeptor fungiert. Diese Komplexe wurden bereits erfolgreich zur Synthese von ein- und doppelsträngigen oligo-DAN-NDI-Foldameren^[118-120], schaltbaren DAN-NDI-Rotaxanen^[121,122] und DAN-NDI Cataxanen^[123-125] verwendet. Der NDI-Akzeptor **35** bildet im Gleichgewicht eine supramolekulare rigid-rod-„ π -Helix“ Überstruktur aus, die als geschlossener Ionenkanal betrachtet werden kann (Abbildung 43B). Abbildung 43D illustriert das interne „Crowding“, die internen repulsiven Wechselwirkungen und die Wasserstoffbrückenbindungen der Seitenarme des NDI **35**. Das Polyphenylrückrad im Inneren des Kanals ist ebenfalls helikal angeordnet. Durch Interkalation des DAN-Liganden **36** kommt es zur Ausbildung von NDI-DAN-NDI-CT-Komplexen (Abbildung 43E). Durch die entstandenen CT-Komplexe kommt es zur Umorientierung der Bausteine **35** und **36** und es bildet sich eine neue Überstruktur, die als rigid-rod „ π -Barrel“ bezeichnet wird und den geöffneten Ionenkanal darstellt (Abbildung 43C). Dieses System wurde in unilamellare Liposomen (LUV), bestehend aus Hühnereiweiß-Phosphatidylcholin, eingebettet und sowohl die Ionenleitfähigkeit bzw. Selektivität als auch der innere Durchmesser des Ionenkanals bestimmt. Das System weist eine leichte Anionenselektivität ($\text{SO}_4^{2-} > \text{NO}_3^- > \text{I}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{AcO}^- > \text{F}^-$) auf und besitzt einen inneren Durchmesser von 3.5 Å. Dieses System ist eines der ersten Beispiele für einen selektiven und gut charakterisierten, synthetischen Ionenkanal.

Ein weiterer synthetischer schaltbarer Ionenkanal, der auf vollkommen anderen Strukturmotiven basiert, wurde von *Jeon et al.* entwickelt.^[105] Curcubit[6]uril (CB[6]) **37** ist ein makrozyklischer Kavitant, der aus sechs Glycouril-Einheiten aufgebaut ist (Abbildung 44). Die hydrophobe Kavität, die durch zwei fransenartige Carbonyl-Portale (Durchmesser 3.9 Å) zugänglich ist, besitzt einen Durchmesser von etwa 5.5 Å.^[126,127] Die rigide Struktur und das Vermögen, Komplexe mit Ionen und Molekülen zu bilden, macht die Verbindungsklasse der Curcubit[n]urile (CB[n]) zu attraktiven Rezeptoren und Bausteinen für supramolekulare Überstrukturen.^[128] CB[6] **37**, eingelagert in unilamellare Liposomen (LUV), ist in der Lage, Protonen und Alkalimetalle über Lipidmembran zu transportieren.^[105,129,130] Der Protonenfluss kann über die pH-sensitive Fluoreszenz-Sonde HPTS (**39**) (Hydroxypyrentrisulfonat),

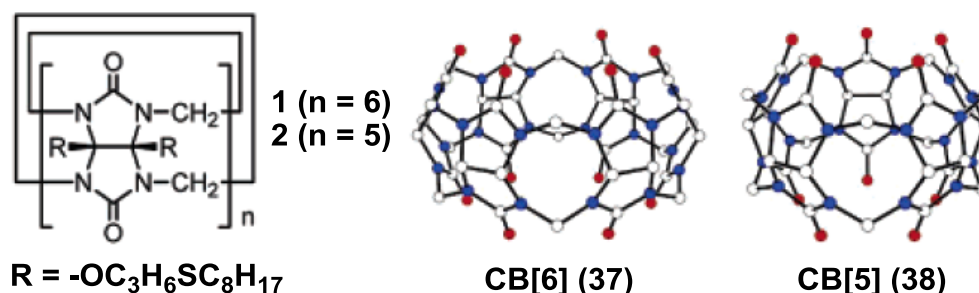


Abbildung 44: Curcubit[n]uril-Ionenkanäle 37 und 38 nach Jeon *et al.*^[105]

welche in die Liposomen inkludiert ist, direkt verfolgt werden. Aus der extravasikulären Zugabe von Salzsäure resultiert ein sofortiges Quenchen der Fluoreszenz des eingelagerten HPTS (39). In Abwesenheit von 37 ist keine Änderung der Fluoreszenz zu beobachten. Des Weiteren führt die Zugabe des Neurotransmitters Acetylcholin, von dem bekannt ist, dass er stabile Wirt-Gast-Komplexe mit CB[6] (37) ausbildet ($K \approx 10^3 \text{ M}^{-1}$ in Wasser)^[131], zur vollständigen Inhibierung der Fluoreszenzlöschung von HPTS (39) (Abbildung 45). Diese Inhibierung ist remineszent zur Blockierung von natürlichen K^+ -Kanälen durch biogene Polyamine.^[132] Somit konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass 37 eine wichtige Rolle beim

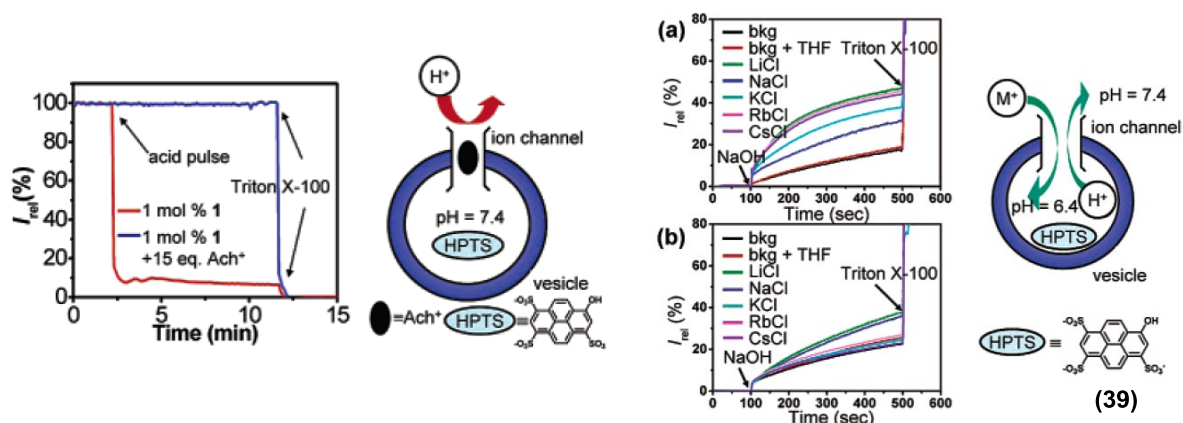


Abbildung 45: links: Mittels Acetylcholin schaltbarer CB[6]-Ionenkanal (Protonen-Transport); rechts: a) Alkali-Ionentransport mittels CB[6] 37; b) Alkali-Ionen-Transport mittels CB[5] 38.^[105]

Transport von Protonen über Lipidmembranen einnehmen kann. CB[6] 37 ist ebenfalls in der Lage, Alkalimetall-Ionen selektiv über eine Membran zu leiten (Abbildung 45a). Hierbei verhält sich die Transportaktivität entgegengesetzt zur Bindungsaffinität^[133] der entsprechenden Alkalimetall-Ionen ($\text{Li}^+ > \text{Cs}^+ \approx \text{Rb}^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+$).^[132,134-136] Das CB[5]-Derivat 38 transportiert lediglich Lithium- und Natrium-Ionen, was im Einklang mit dem kleineren Durchmesser des Carbonylportals steht (Durchmesser = 2.4 \AA) (Abbildung 45b). Des Weiteren konnte geklärt werden, dass der Ionentransport durch den Curcubit[6]-Kanal 37 dem Ionenkanal-Mechanismus unterliegt (Ionenfluss $\sim 10^7$ Ionen/s). Er ist vergleichbar mit dem des natürlich vorkommenden Gramicidins.^[137] Dieser, zum Transport von Protonen und Alkalimetall-

ständig inhibiert. Wird 1-Hydroxy-2-naphthylaldehyd (**41**) zu diesem System zugegeben, bildet sich mit dem Rezeptor **40** die Schiff'sche Base **42**, welche einen hervorragenden, bidentaten Chelatliganden für die, am aktiven Zentrum befindlichen Kupfer(II)-Ionen darstellt. Die inhibierenden Kationen werden durch zwei der neu gebildeten, sich in einem reversiblen Gleichgewicht befindenden Chelatliganden, in einem vierfach koordinierten Kupfer-Komplex gebunden. Somit wird die Enzymaktivität wieder hergestellt und Pyruvat wieder zu *L*-Lactat reduziert (vgl. Abbildung 46 unten). Dieses ist das erste Beispiel für ein supra-molekulares System, in dem ein zelloberflächengebundener Rezeptor in der Lage ist, Enzymaktivität durch hintereinander geschaltete Signalerkennung und Phasenreorganisation zu steuern. Allerdings handelt es sich bei diesem System nicht um ein transmembranes Signaltransduktionssystem, da sämtliche Vorgänge nur auf der extrazellulären Seite der Vesikelmembran ablaufen.

Das bisher einzige künstliche transmembrane Signaltransduktionssystem wurde durch *Hunter et al.* vorgestellt.^[143] Dieses System ist in Anlehnung an die Rezeptor-Tyrosinkinasen aufgebaut.^[144] In einem sehr eleganten Experiment wurden zwei konformativ starre Transmembranbausteine **43** und **44** in DPPC-Liposomen eingelagert (Abbildung 47).

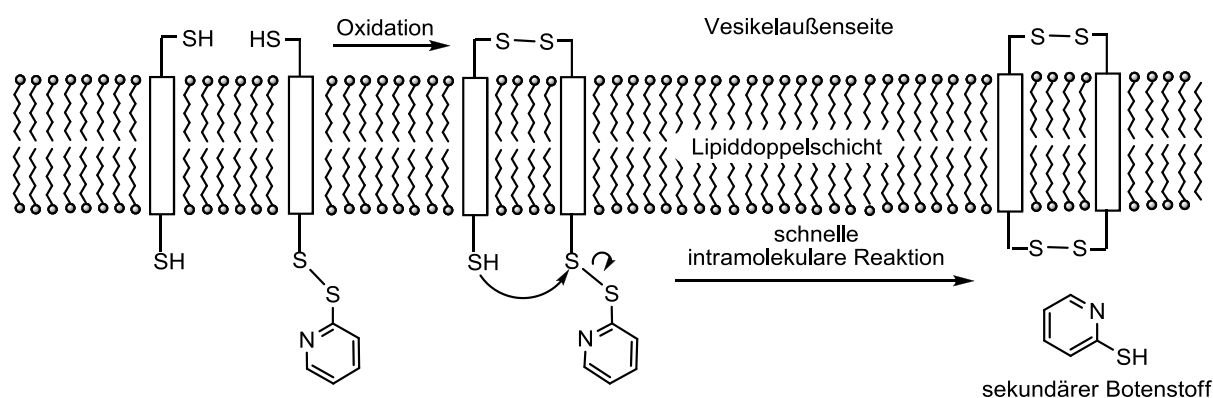


Abbildung 47: Signaltransduktionssystem nach *Hunter et. al.*^[143]

Ein Transmembranrezeptormonomer besitzt zwei terminale cysteinische Thiolfunktionen, das andere ist an beiden Seiten mit disulfidisch gebundenen 2-Thiopyridineinheiten modifiziert (Abbildung 48). In dem Signaltransduktionsexperiment wird im ersten Schritt der Baustein **44** (Abbildung 48) durch die Reduktion der extravasikulären Disulfide desymmetrisiert (**45**). Durch diesen Schritt wird das System aktiviert. Durch Oxidation der extrazellulären Thiolfunktionen mit Kaliumhexacyanoferrat(II) zum Disulfid nähern sich die Kopfgruppen des starren Transmembrangerüsts auf der cytosolischen Seite der Doppellipidschicht an. Durch den verringerten räumlichen Abstand wird eine nucleophile Substitutionsreaktion eingeleitet, in der das 2-Thiopyridin unter Bildung eines makrozyklischen Dimers freigesetzt

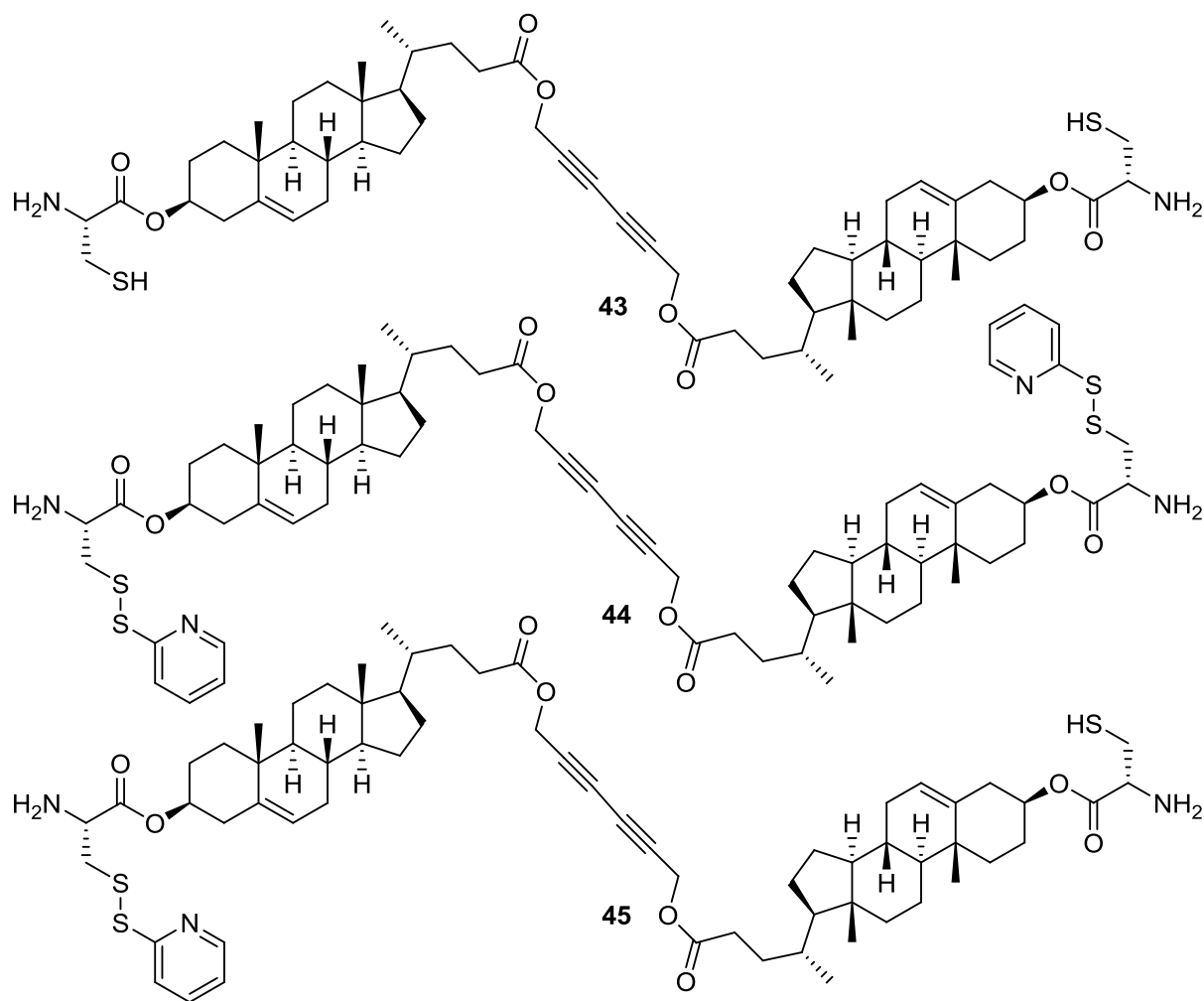


Abbildung 48: Transmembranbausteine nach Hunter et al.^[143]

wird (Abbildung 47). Das 2-Thiopyridin imitiert hierbei einen sekundären Botenstoff, der mittels UV-Vis-Spektroskopie detektierbar ist (Absorptionsmaximum: 341 nm), da es, im Vergleich zum gebundenen Zustand ein anderes Absorptionsmaximum aufweist. Das Transmembransegment basiert auf einem Dimer der 3β -Hydroxy-5-choleinsäure. Diese besitzt einen hydrophoben Charakter und ist somit befähigt, sich in den hydrophoben Teil der Lipiddoppelschicht einzulagern. Hunter etablierte somit ein System, das ein extrazelluläres Signal (in diesem Fall die Oxidation) über eine künstliche Membran in ein intrazelluläres Signal, sekundärer Botenstoff 2-Thiopyridin, überführen kann. Die Reaktion auf das extrazelluläre Signal ist allerdings nicht sehr spezifisch, da fast alle oxidativen Bedingungen zu einer Signaltransduktion führen.

Auf diesem Gebiet wurden weiterführende Arbeiten von Hunter et al. durchgeführt.^[145,146] Sie beschäftigen sich vordergründig mit der kooperativen Bindung an Membranoberflächen und der Weitergabe von Bindungsinformationen über Lipiddoppelschichten.^[145,146] Das kooperative Bindungsverhalten von membrangebundenen Rezeptoren ist ein fundamental wichtiger Prozess in der Natur.^[147,148] Es wird davon ausgegangen, dass der

Prozess der Signaltransduktion durch „laterales Clustering“ der Membranrezeptoren reguliert wird.^[149-151] Die hohe Bedeutung dieses Vorgangs konnte bestätigt werden, nachdem gezeigt wurde, dass multivalente Liganden mit angehängten Zuckern eine Aggregation von Rezeptoren innerhalb einer Biomembran induzieren und eine chemotaktische Antwort hervorrufen.^[152] Die Größe der gebildeten Aggregate ist dabei ebenfalls ausschlaggebend. Beispielsweise sind die Tetramere des chemotaktischen Tar-Rezeptors in der Signaltransduktion signifikant aktiver als der einzelne oder die dimeren Rezeptoren.^[153] Der Grund hierfür liegt in der eingeschränkten Beweglichkeit von membranverankerten Rezeptoren, da sie sich nur in zwei Dimensionen bewegen können. Damit sind bindende Wechselwirkungen gegenüber dreidimensional beweglichen Molekülen in freier Lösung thermodynamisch deutlich begünstigt. Bisher wurden nur wenige quantitative Studien zur Bestimmung von Bindungskonstanten in der Umgebung von Membranoberflächen angefertigt, da bei deren Bestimmung zwei besondere Probleme auftreten. Zum Einen ist es nicht möglich, die ermittelten Bindungskonstanten mit denen in freier Lösung zu vergleichen, da sich die Assoziationskonstanten mit dem Lipid/Rezeptor-Verhältnis verändern.^[154] Das zweite Problem liegt in der deutlich veränderten Umgebung der Membranoberfläche, in der sich die intrinsischen Bindungskonstanten drastisch verändern. Zur Untersuchung des kooperativen Bindungs-

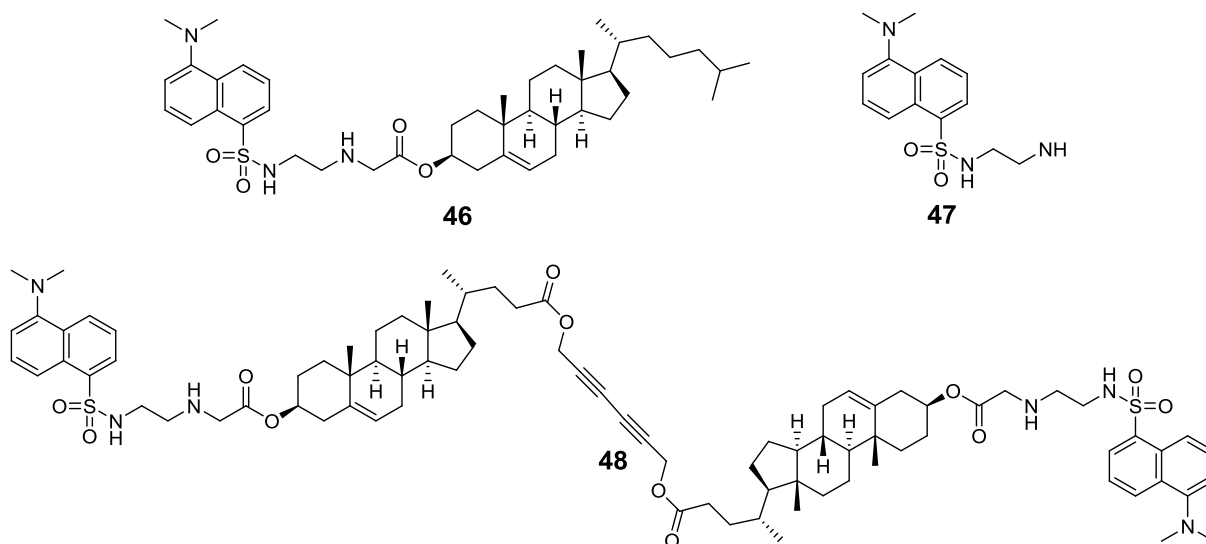


Abbildung 49: Transmembranbausteine nach Hunter et al (2. Generation).^[145]

verhaltens von Rezeptoren, eingebettet in eine Membranoberfläche, wurde von Hunter et al. ein Cholesterollipidanker mit einem Konjugat aus Ethylendiamin und einem Dansylfluorophor als Kopfgruppe funktionalisiert (Abbildung 49, 46).^[146] Als Referenzsubstanz zur Bestimmung der Bindungskonstanten in freier Lösung wurde die fluoreszierende Kopfgruppe 47 ohne Steroidanker verwendet. Der Dansylfluorophor kann Aufschluss über die Mikro-

umgebung in der Membran und die Koordination von zugegebenen Kupfer(II)-Ionen durch Löschung der Fluoreszenz geben. Einleitende Bindungsstudien in freier, wässriger, gepufferter Lösung zeigten, dass die Affinität der Kontrollsubstanz **47** bezüglich Kupfer(II)-Ionen gering ist ($\sim 10^2 \text{ M}^{-1}$). Es konnten ausschließlich 1:1-Komplexe beobachtet werden. Für den Rezeptor **46**, eingelagert in unilamellare Liposomen (LUV; 800 nm), konnte hingegen eine deutlich höhere Bindungskonstante K_1 bestimmt werden. Im Gegensatz zur freien Lösung werden fast ausschließlich 2:1-Komplexe gebildet (Abbildung 50 rechts). Die Bindungskonstanten K_1 und K_2 lagen im Bereich von 10^4 M^{-1} . Die Tatsache, dass die Bindungskonstante für den membrangebundenen Rezeptor um zwei Größenordnungen höher ist, als in freier Lösung, ist sehr wichtig, da die Immobilisierung in der Membran keinen entropischen Energiegewinn in diesem Prozess gibt. Dieser Zusammenhang verdeutlicht, dass die Membran-

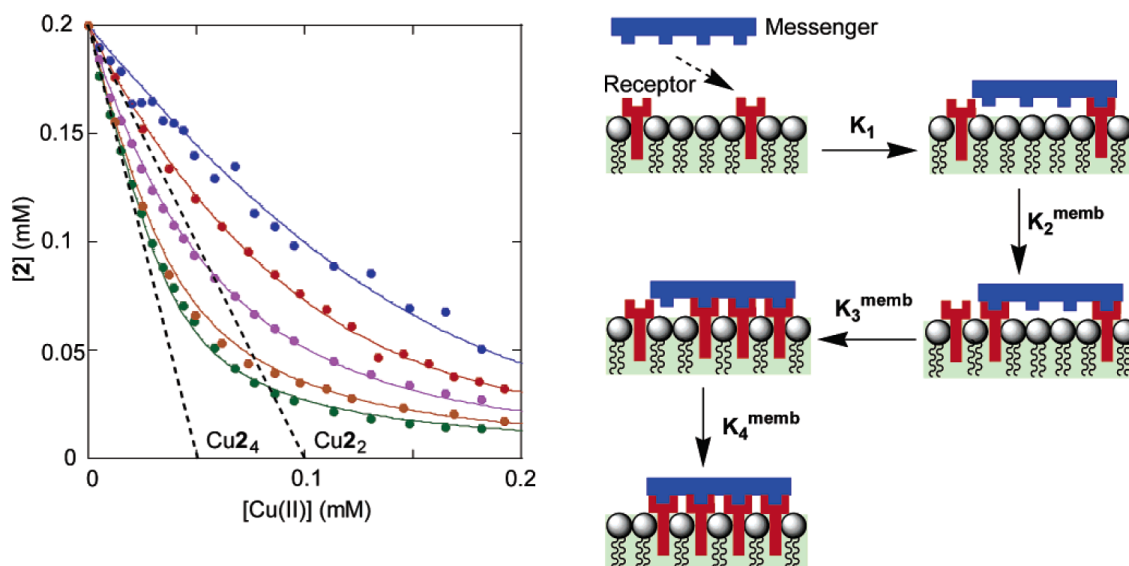


Abbildung 50: Sequentielle Bindung eines Botenstoffs an einen membrangebundenen Rezeptor.^[146]

umgebung einen großen Einfluss auf die bindenden Wechselwirkungen hat. Titrations mit dem Baustein **46** ergaben, dass sowohl die Bindungskonstanten K als auch die jeweils vorliegende Komplexstöchiometrie von der Rezeptorkonzentration in der Doppelmembran abhängig ist. Titrations mit konstanter Rezeptorkonzentration und sukzessiv erhöhter Lipidkonzentration veranschaulichten, dass sich die Bindungsaffinität dramatisch erhöht und sich die Komplexstöchiometrie von einem 2:1- zu einem 4:1-Komplex, der in Lösung nicht beobachtet werden kann, erhöht wird und die Hauptspezies darstellt (Abbildung 50 rechts). Die ermittelte Bindungskonstante K_2^{obs} weist eine lineare Abhängigkeit von der resultierenden Rezeptorkonzentration in der Membran auf (Abbildung 51). Die intrinsische Bindungskonstante K_2^{memb} konnte mit Hilfe des folgenden Ausdrucks bestimmt werden:

$$K_n^{obs} = \left(\frac{K_n^{memb}}{100[R]_T V_m} \right) \chi \quad (1)^{[146]}$$

Für die bestimmte Bindungskonstante K_2^{memb} ergibt sich ein Wert von 100 M^{-1} , was bedeutet, dass die intrinsische Bindung deutlich geringer ist als in freier Lösung. Die Bildung eines CuXX_2 -Komplexes in der Membran unterliegt folglich kooperativen Effekten. Dieser Zusammenhang wird in Abbildung 52 rechts verdeutlicht. Bei einem geringen Rezeptoranteil in der Membran kommt es sogar zu einem negativ-kooperativen Effekt. Die Bindungskonstante K_2^{obs} ist in diesem Fall geringer als in freier Lösung. Dieses System illustriert, wie es Zellen möglich sein könnte, die Produktion eines speziellen Typs von Ligand-Rezeptor-Clustern durch Erhöhung bzw. Erniedrigung der Rezeptorkonzentration zu steuern. Die Rezeptoraggregation gibt der Zelle vielseitige Mechanismen, die Antwort auf einen Messenger zu kontrollieren. Abbildung 53 zeigt, wie es möglich ist, durch eine gezielte Wahl der Rezeptorkonzentration einen Hauptkomplex bevorzugt zu populieren. Wird die Rezeptorkonzentration erhöht, kommt es zu einer Erhöhung der Komplexstöchiometrie. Bei niedrigen Konzentrationen treten Bindungs-Wechselwirkungen intravesikulärer Art in den Vordergrund. Diese eindrucksvollen Ergebnisse wurden von *Hunter et. al.* auf neue Systeme mit transmembranen Bausteinen erweitert und genaueren Betrachtungen unterzogen.^[145] Hier-

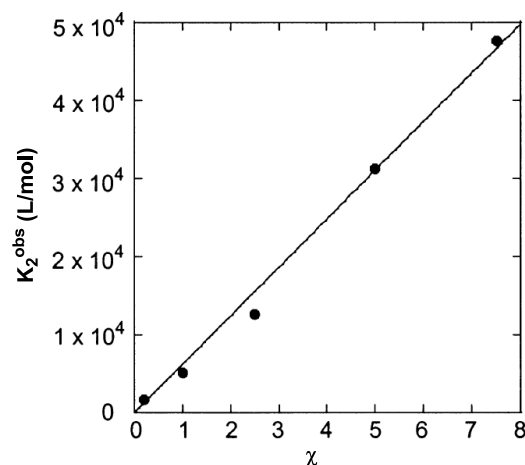


Abbildung 51: lineare Abhängigkeit der Bindungskonstanten K_2^{obs} von der Gesamtrezeptorkonzentration 46 in der Membran.^[146]

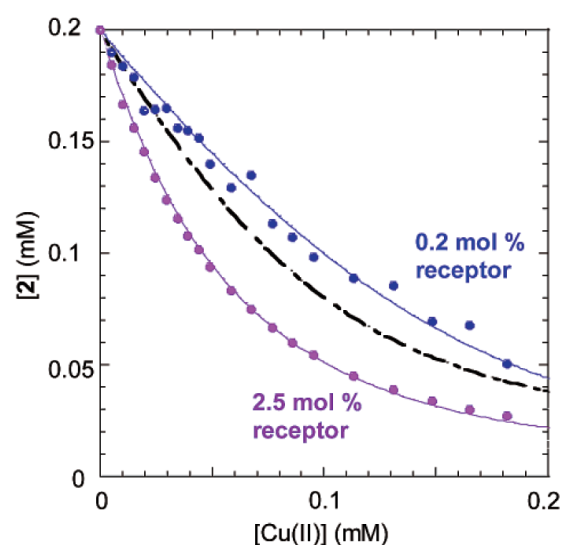
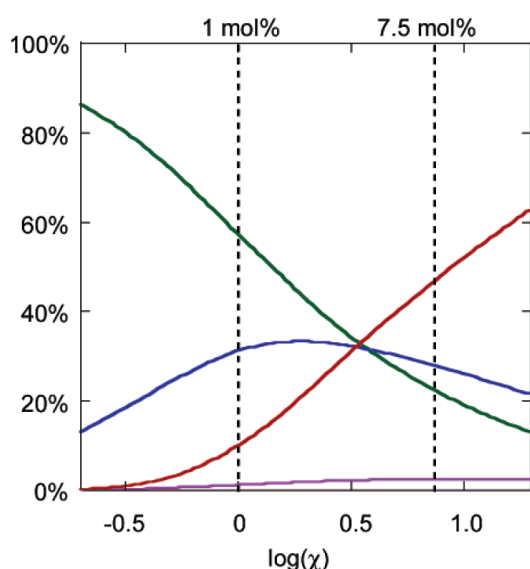


Abbildung 52: links: Anteil der in Abhängigkeit der Rezeptorkonzentration gebildeten Komplexstöchiometrien (grün: CuXX ; blau: CuXX_2 ; violett: CuXX_3 ; rot: CuXX_4); rechts: Einfluss der Rezeptorkonzentration auf die intrinsische Bindungskonstante (schwarz: Rezeptor 47 in Lsg; blau/violett: Rezeptor 46 im Lipid).

zu wurde der membrandurchspannende Rezeptor **48** (Abbildung 49) synthetisiert, der in der Lage ist, Bindungsinformationen in den intrazellulären Raum einer künstlichen Lipid-Doppelmembran zu übertragen (Abbildung 54 unten). Die bindende Wechselwirkung ba-

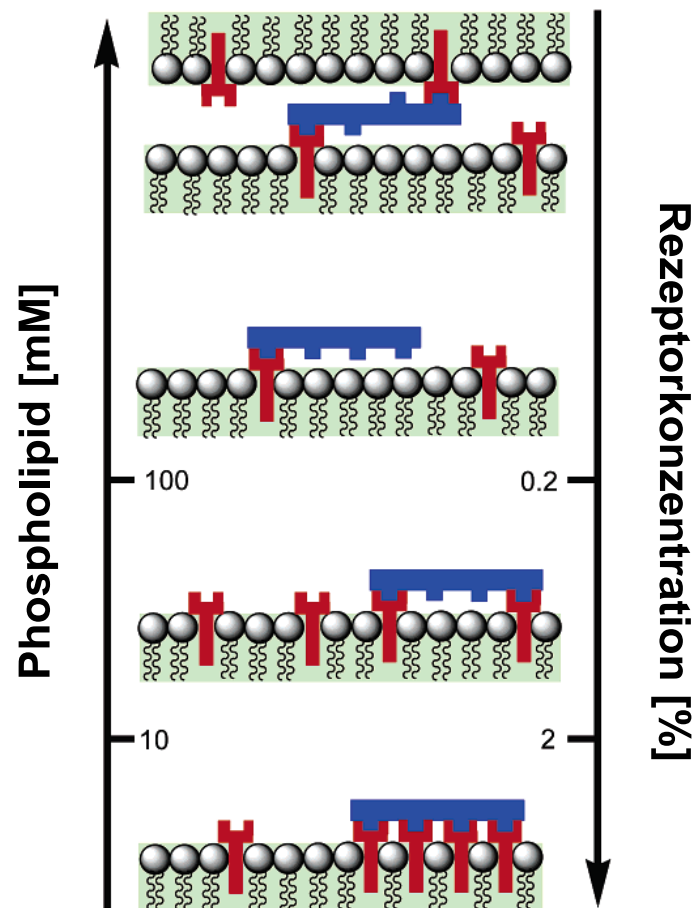


Abbildung 53: Abhängigkeit der Bindungsart von der Rezeptorkonzentration.^[146]

siert auf einer Aggregation des Rezeptors **48**, eingeleitet durch die Zugabe von Kupfer(II)-Ionen über die Komplexbildung der Ethylendiaminfunktionen, in Anlehnung an das zuvor beschriebene System.^[146] Der Vergleich der Fluoreszenzlöschung mit dem Kontrollrezeptor **46** (Abbildung 54 oben/schwarz) macht deutlich, dass die Stärke der Komplexbildung im Falle des transmembranen Rezeptors **48** (Abbildung 54 oben/grau) deutlich höher ist als beim nicht-durchspannenden Kontrollrezeptor **46** (Abbildung 54 oben/schwarz). Da die intrinsische Bindungsstärke für Kupfer(II)-Ionen für beide Rezeptoren gleich sein sollte, kann daraus geschlossen werden, dass synergistische Effekte auf der Innen- und Außenseite der Membran bei bewiesener Membrangängigkeit von Cu(II)-Ionen zu der erhöhten Bindungsstärke führen. Dieses System ist das erste künstliche System bei dem die Bindung eines Botenstoffs im extrazellulären Raum zu einer kooperativen Bindung auf der cytosolischen Seite der Membran führt. In Anlehnung an biologisch aktive Systeme ist somit eine Grund-

lage geschaffen worden, in Zukunft effektivere künstliche Signaltransduktionssysteme zu entwickeln.

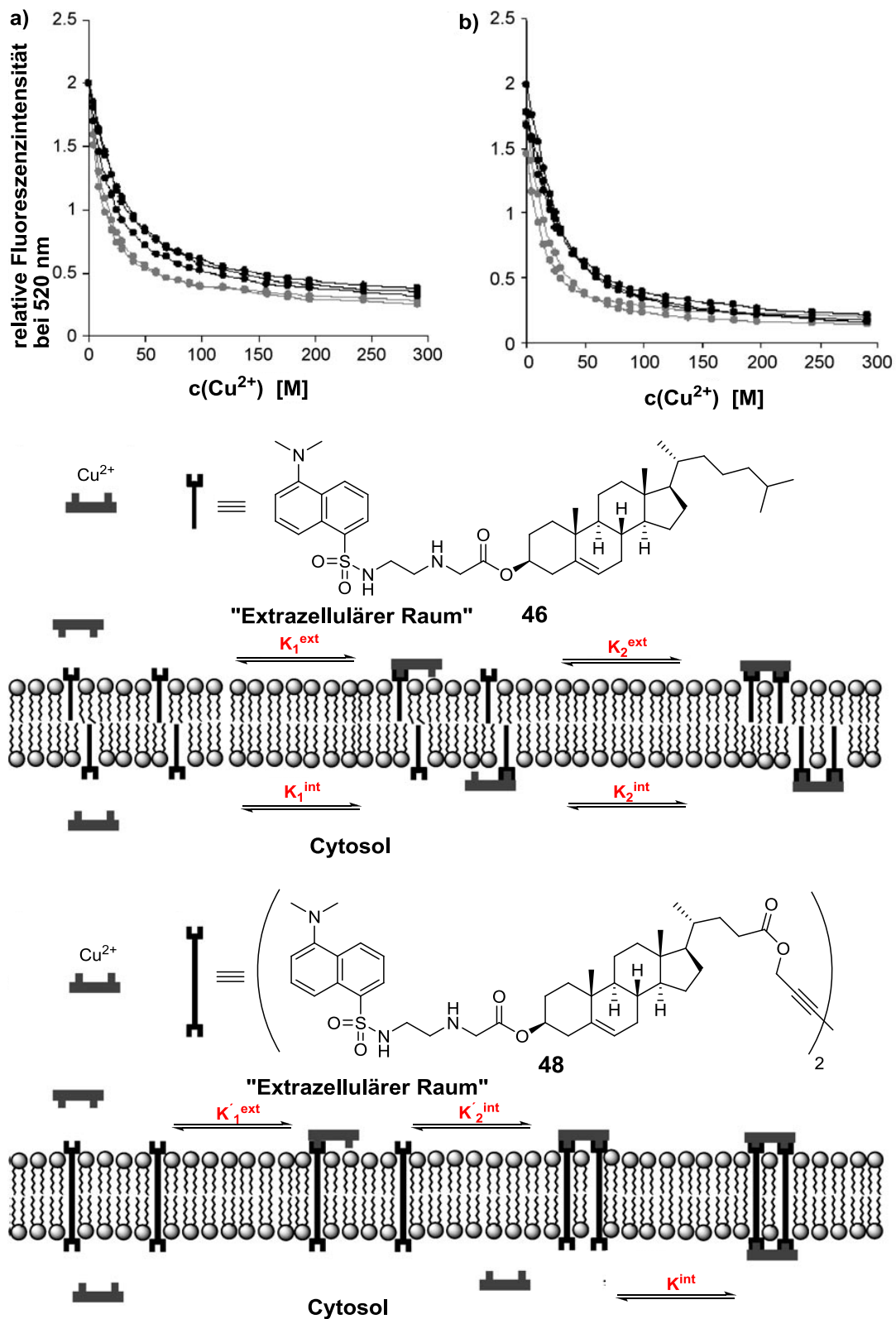


Abbildung 54: Übertragung von kooperativen Bindungsinformationen über eine Lipidmembran^[146] a) 1 % 46 und 48; b) 2.5 % 46 und 48.

Die Arbeitsgruppe von *Schrader et al.* entwickelte, basierend auf dem *Hunter'schen* Signaltransduktionssystem^[143], das erste künstliche System zur adrenalininduzierten Signaltransduktion. Dazu wurden eine Bisphosphonatpinzette^[3,155] und eine Phenylboronsäurefunktion^[156-173] mit den Köpfen zweier Transmembransegmente (**49/50**) verknüpft (Abbildung 55). Diese monotopischen Transmembranbausteine **49** und **50** sind an den gegen-

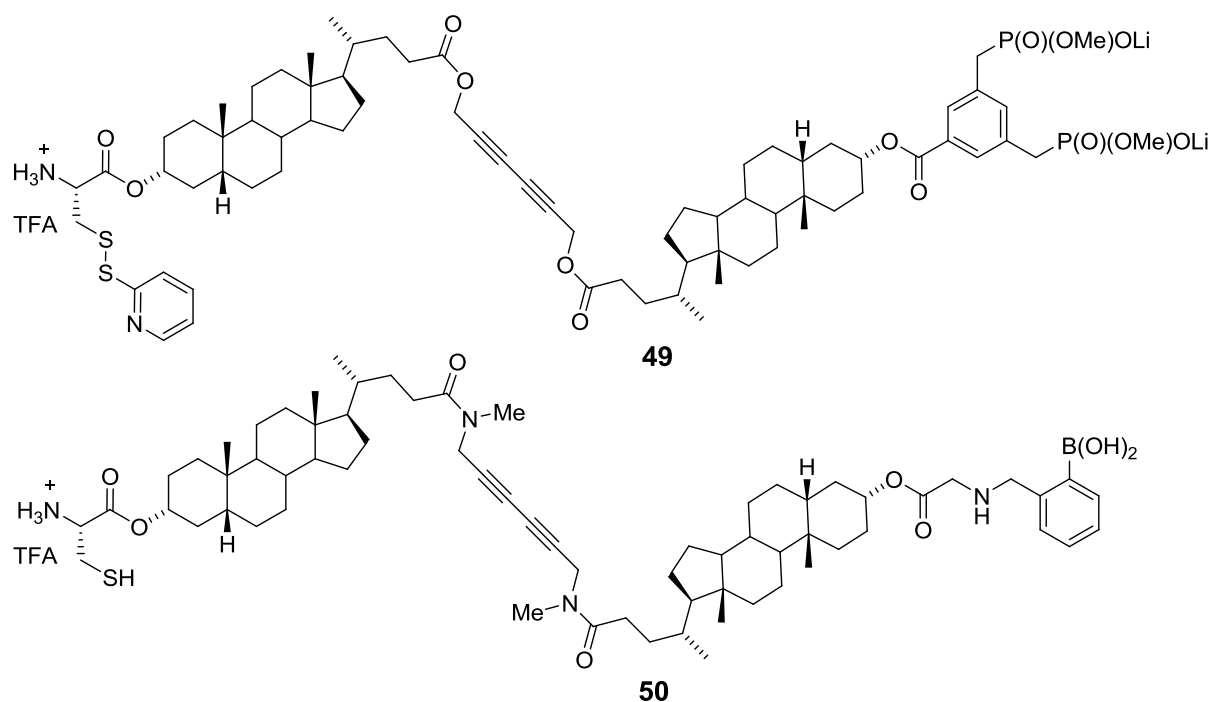


Abbildung 55: Transmembranbausteine **49** und **50** nach *Maue und Ellermann* mit ditopischen Rezeptoreinheiten.^[173-176]

überliegenden Enden mit der bekannten freien Thiolfunktion, bzw. dem disulfidisch gebundenen sekundären Botenstoff modifiziert.^[143] Die in eine Liposomenmembran eingelagerten Transmembranbausteine **49** und **50** sollten durch Adrenalinzugabe (primärer Botenstoff) dimerisieren und so die Abspaltung des 2-Thiopyridin (sekundärer Botenstoff) auf der intrazellulären Seite induzieren (Abbildung 56).

Die herausragende Selektivität der Komplexierung von Guanidinen und Aminoalkoholen gegenüber einfachen Aminen durch Bisphosphonate wurde erstmals 1996 durch *Schrader* publiziert.^[155] Seitdem wurde in der Arbeitsgruppe eine Reihe von Catecholaminrezeptoren synthetisiert.^[3,177-180] Die Rezeptoren basieren allesamt auf *m*- und *p*-Xylylenbisphosphonatpinzetten. Diese binden in DMSO hochselektiv 1,2-Aminoalkohole gegenüber Aminen. Die Bindung erfolgt über eine, durch multiple Wasserstoffbrückenbindungen verstärkte, Coulombwechselwirkung (Abbildung 57). Dabei führt die zusätzliche Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Phosphonat und der Hydroxyfunktion der Aminoalkohole im Vergleich zu einfachen Aminen zu drastisch höheren Bindungskonstanten.^[181]

Die Bindungskonstante zwischen der *m*-Xylylen-bisphosphonatpinzette und 2-Hydroxy-2-phenethylamin betrug in DMSO $5.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$.^[182]

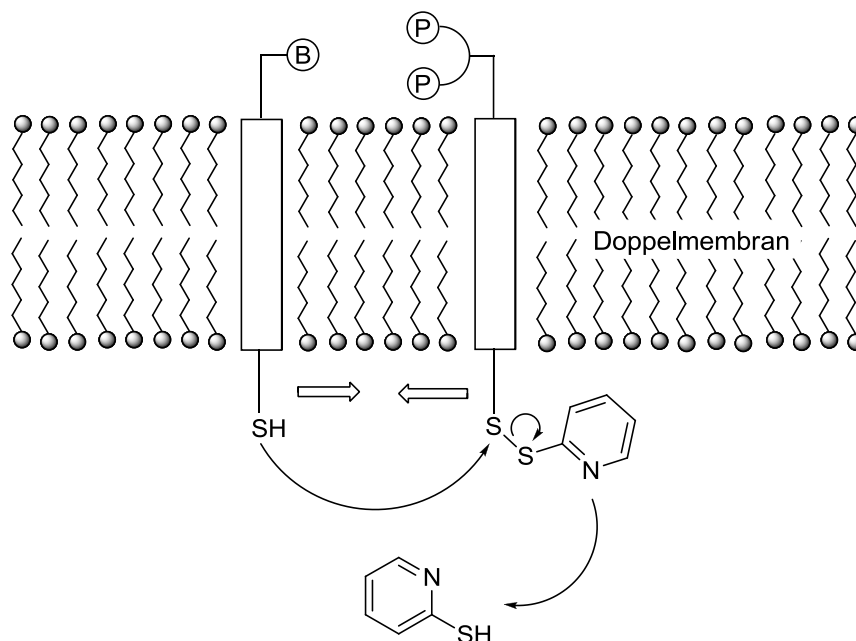


Abbildung 56: Signaltransduktionssystem nach Maue.^[174-176]

Phenylboronsäuren wurden bald nach ihrer Entdeckung zur Erkennung von Sacchariden und vicinalen 1,2-Diolen eingesetzt.^[159,166,183-210] Die Wechselwirkung beruht auf der Ausbildung von Catechol-Boronsäureestern. Diese reversible kovalente Bindung ist selbst in wässrigem Medium ($\text{pH} > 9$) stabil. Die Einführung einer Methylaminofunktion in *ortho*-Position erlaubt sogar die Verwendung neutraler, gepufferter, wässriger Lösungen. Es gibt zwei konkurrierende Theorien über die möglichen Gründe für diese Stabilisierung (Abbildung 57). Die eine besagt, dass sich eine B-N-Bindung ausbildet, und die andere, dass aufgrund der Solvolyse von Wasser/Methanol ein getrenntes Boronatanion und ein Ammoniumkation entstehen. Beide Theorien haben allerdings gemeinsam, dass sich die hydrolyse-

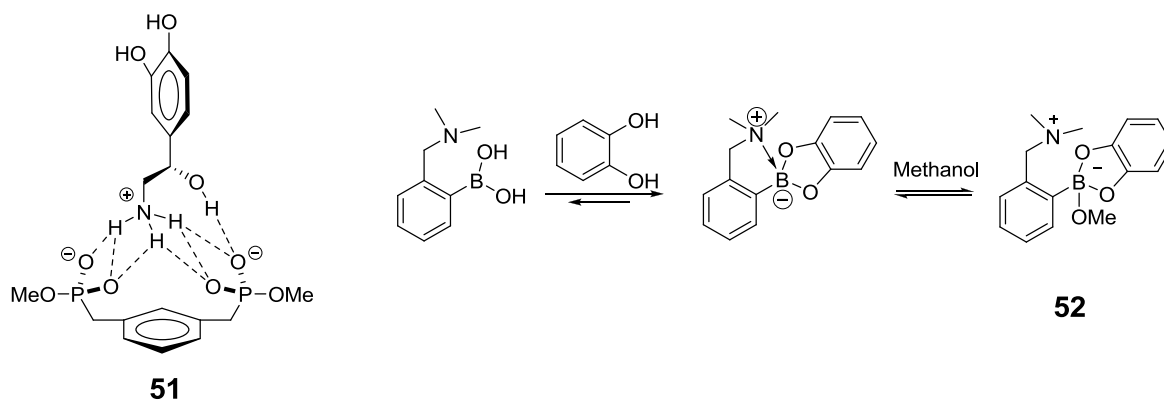


Abbildung 57: Bindungsmotive der Bisphosphonatpinzette 51 und der Phenylboronsäure 52.^[210]

empfindliche sp^2 -Hybridisierung des Boratoms in eine stabilere sp^3 -Hybridisierung ändert.

Von *Schrader et al.* wurde, basierend auf diesen literaturbekannten Vorbildern, ein ditopischer Rezeptor **53** entwickelt, der die beiden Erkennungseinheiten Phenylboronsäure und Bisphosphonat in einem Rezeptor vereinigte. Durch Separierung der beiden Bindungsmotive durch einen geeigneten Spacer konnte die höchste Selektivität für die Erkennung von Catecholaminen in Wasser erreicht werden.^[179] Dieses Rezeptorsystem konnte mit Hilfe eines Farbausays zudem quantitativ Catecholamine in physiologischen Medien bestimmen (Abbildung 58). Hierbei nutzte man die Eigenschaft eines Chromophors, im Komplex mit dem Wirt eine andere Absorptionsbande aufzuweisen als in freier Lösung. Bei der Verdrängung des Chromophors (Alizarin Komplexon) durch den eigentlichen Gast lassen sich durch Änderungen im Extinktionskoeffizienten die Bindungskonstanten ermitteln. Die so bestimmte Bindungskonstante von Noradrenalin in gepufferter, wässriger Lösung beträgt 350 L/mol, wohingegen mit Phenylalanin und Tyrosin Bindungskonstanten kleiner 10 L/mol ermittelt werden konnten.

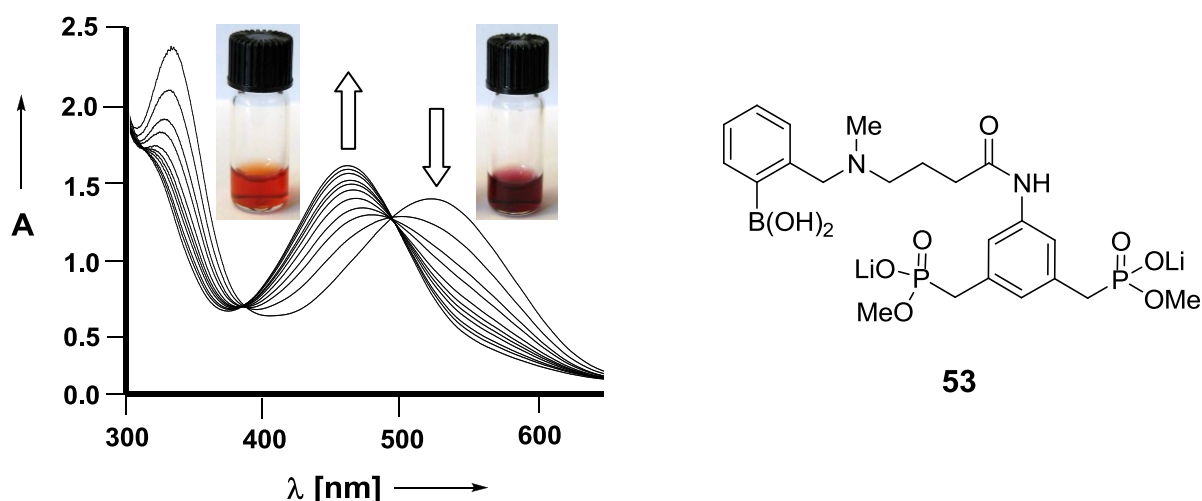


Abbildung 58: Hochselektiver Adrenalinrezeptor **53** nach *Maue*.^[177]

Durch Filmwaagenexperimente mit den „halben“ Transmembranbausteinen **54** und **55** (Abbildung 59) konnte eindrucksvoll die kooperative Bindung, welche eine Grundvoraussetzung für ein Gelingen der Signaltransduktion ist, von Noradrenalin durch die monotopischen Erkennungseinheiten nachgewiesen werden (Abbildung 60). Ferner konnten mit den Filmwaagenexperimenten Bedenken über die Verwendung von Lithocholsäure als Transmembransegment ausgeschlossen werden. Der Knick im Steroidgerüst der Lithocholsäure behindert die Einlagerung in die Monoschicht nicht. Diese Beobachtung wird auch durch die Experimente von *Kikuchi* bestätigt.^[211,212]

Ermutigt durch die positiven Resultate der Filmwaagenexperimente wurde eine ganze Reihe von Lithocholsäure-basierenden Transmembranbausteinen in teilweise sehr auf-

wändigen Synthesen dargestellt (vgl. Abbildung 55, 61, 64) und in zahlreichen Signaltransduktionsexperimenten untersucht. So wurde versucht, mit den Lithocholsäureanaloga der *Hunter'schen* Transmembranbausteine **56** und **57** das *Hunter'sche* Originalexperiment, die

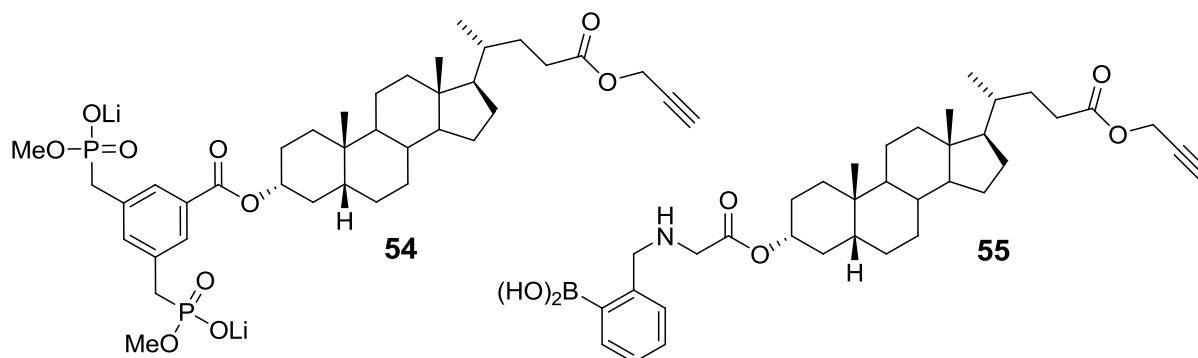


Abbildung 59: „Halbe“ Transmembranbausteine **54** und **55** mit Bisphosphonat- bzw. Boronsäure-Rezeptoreinheit.^[174]

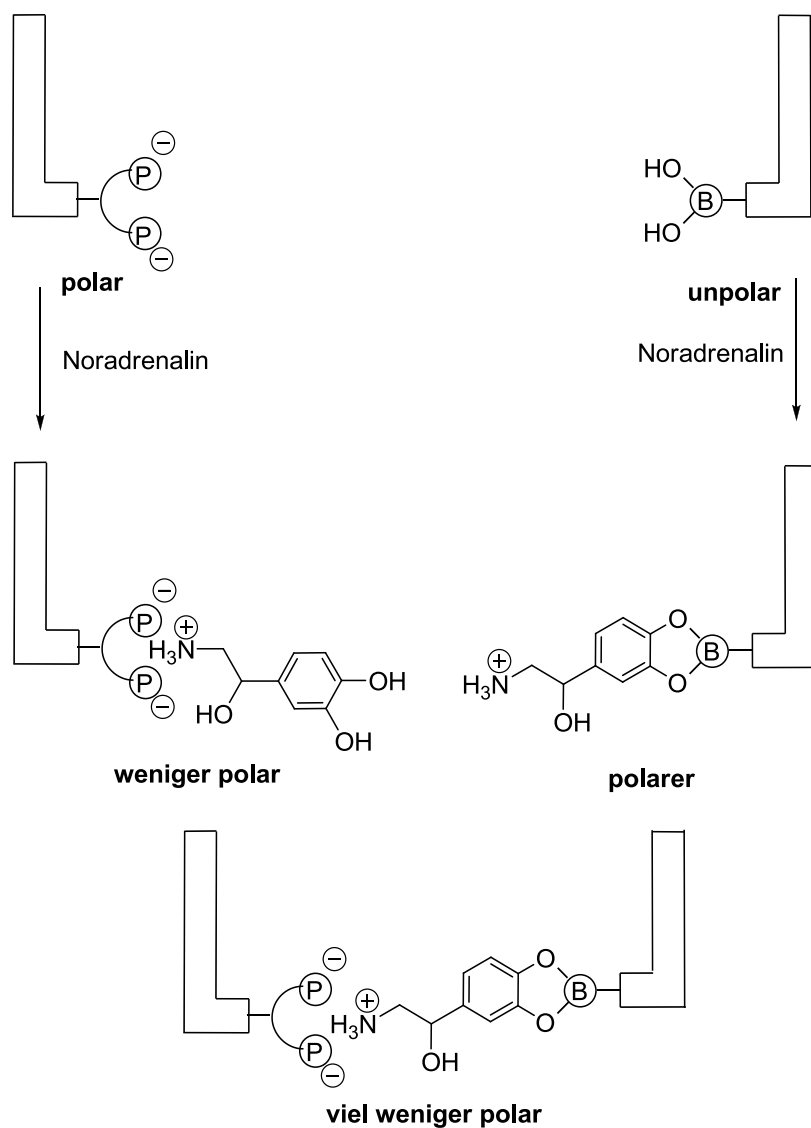


Abbildung 60: Filmwaagenexperimente mit den „halben“ Bausteinen **54** und **55**.^[174]

durch Oxidation induzierte Signaltransduktion, zu reproduzieren (Abbildung 47). Aufgrund der massiven Überlagerung unterschiedlichster Effekte auf die Absorptionsintensität, wie z.B. unterschiedlicher Absorption des Oxidationsmittels Kaliumhexacyanoferrat(III) und dem entstehenden Kaliumhexacyanoferrat(II), konnte das *Hunter'sche* Originalexperiment nicht nachvollzogen werden. Allerdings konnte durch die Abspaltung des 2-Thiopyridins nach der Zugabe des Reduktionsmittels indirekt die erfolgreiche Einlagerung der beiden auf der Lithocholsäure basierenden Bausteine **56** und **57** bewiesen werden.

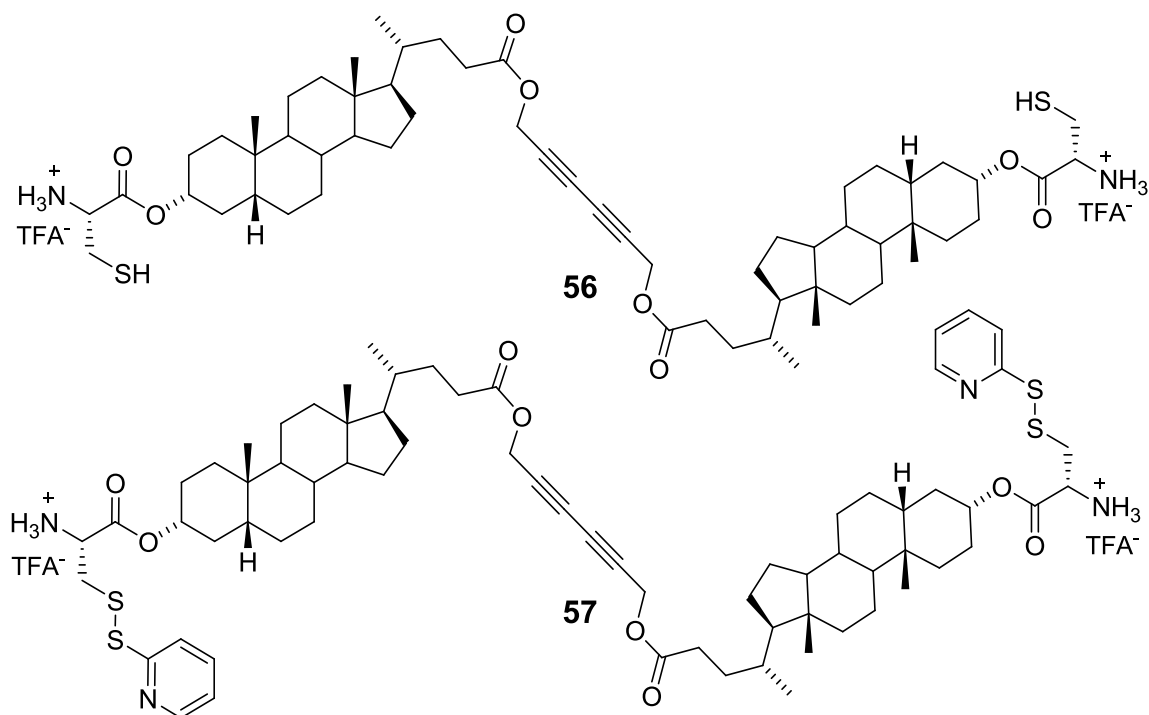


Abbildung 61: Lithocholsäureanaloge **56** und **57** der Hunter'schen Transmembranbausteine nach Schrader et al.^[174]

Unter Verwendung der Transmembranbausteine **49** und **50** konnte eine Signaltransduktion nicht eindeutig nachgewiesen werden, da eine Reihe von grundlegenden Problemen entweder die Signaltransduktion selbst oder deren Detektion verhinderten. Sehr wahrscheinlich führte die Bildung von unproduktiven Dimeren im Fall des Boronsäure-Transmembranbausteins **50** und des Bisphosphonat-Transmembranbausteins **57** zu einer starken Behinderung der Signaltransduktion (Abbildung 62). Daraufhin wurde das System vereinfacht, indem nur noch die Bisphosphonatbausteine **49** und **58** zur amin-induzierten Signaltransduktion eingesetzt wurden, da deren Dimere durch Bisphosphonat-Ammonium-Wechselwirkung weniger stabil waren. Der maximal zu erwartende Anstieg der Absorption durch die Signaltransduktion ist durch die statistische Einlagerung der Bausteine und die statistische Bildung von ternären Komplexen extrem gering (Abbildung 63). Zusätzlich wird die Detektion durch die stark erhöhte Lichtstreuung bzw. Trübung der Liposomenlösungen bei Zugabe des primären Botenstoffs DET zu den **49** und **58**-dotierten Liposomen er-

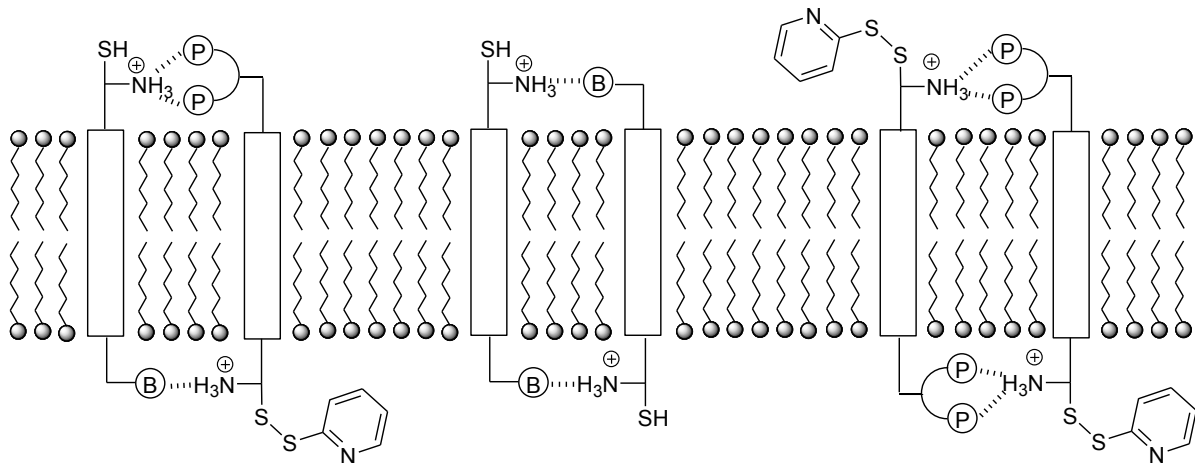


Abbildung 62: Unproduktive zyklische Komplexe im Liposom, die bei Anwesenheit freier Ammoniumgruppen auftreten können.

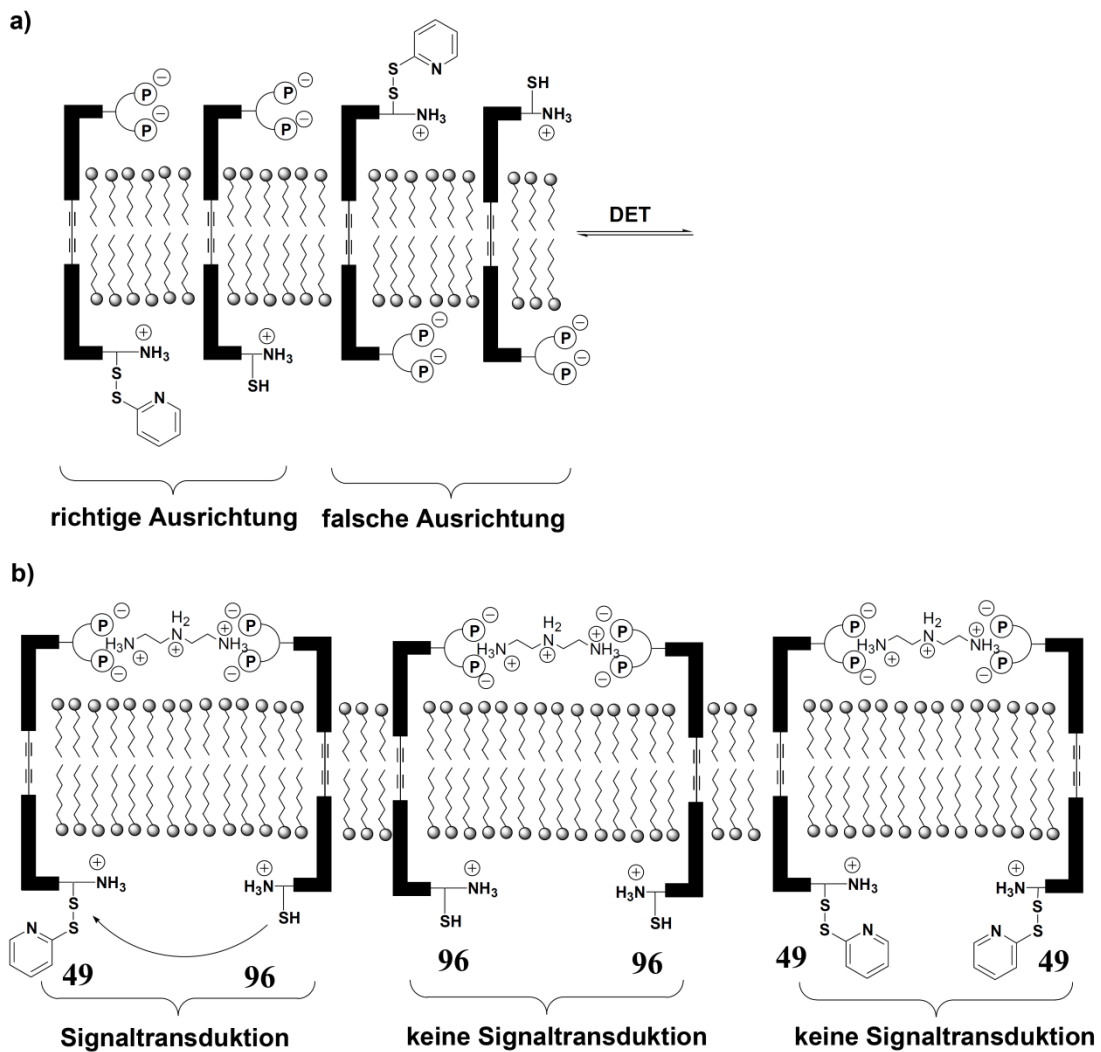


Abbildung 63: Statistische Einlagerung der Transmembranbausteine 49 und 58.^[174]

schwert; die Verwendung von anderen Triaminen wie Spermidin-Trihydrochlorid führte sogar zu noch größeren unspezifischen Effekten (> 0.5). Das Messverfahren ähnelt einer Blackbox, da man keinen Einblick in die Vorgänge auf molekularer Ebene hat. Effekte durch erfolgreiche Signaltransduktion und unspezifische Effekte durch Trübung sind außerdem nur schwer auseinander zu halten.

Der Versuch, dieses Problem mittels NMR-Spektroskopie zu umgehen, war nur in Teilen erfolgreich. Zwar konnten NMR-Spektren von 5 % **49**-dotierten DPPC-Liposomen (10 mM DPPC in D_2O) gemessen werden, allerdings waren die Auflösung und das Signal-Rausch-Verhältnis im wichtigen aromatischen Bereich sehr schlecht. Ein Versuch, den **49**-Anteil auf 10 % zu erhöhen schlug fehl, da bei diesem Verhältnis die Liposomen nicht mehr stabil waren.

Das größte und sicherlich grundlegendste Problem ist, die frühzeitige Reaktion der Thiol- und der Disulfidfunktion der Transmembranbausteine **49** und **58** während der Präparation der Liposomen, unabhängig von der Art des Botenstoffs. Weder die Veränderung der Lösungsmittelpolarität noch die Modifikation der Liposomenpräparation (die Bausteine **49** und **58** sollten erst im fertigen Liposom vereinigt werden), konnten dieses Problem beheben.

Ein weiteres mögliches Problem stellte der Knick im Steroidgerüst der Lithocholsäure dar. Im ungünstigsten Fall sind die reaktiven intrazellulären Kopfenden voneinander weggedreht und müssen sich zur Abspaltung des sekundären Botenstoffs aufeinander zu bewegen. Obwohl die Doppellipidmembran für diese Bewegung die nötige Fluidität besitzen sollte, könnte dies die Signaltransduktion verlangsamen.

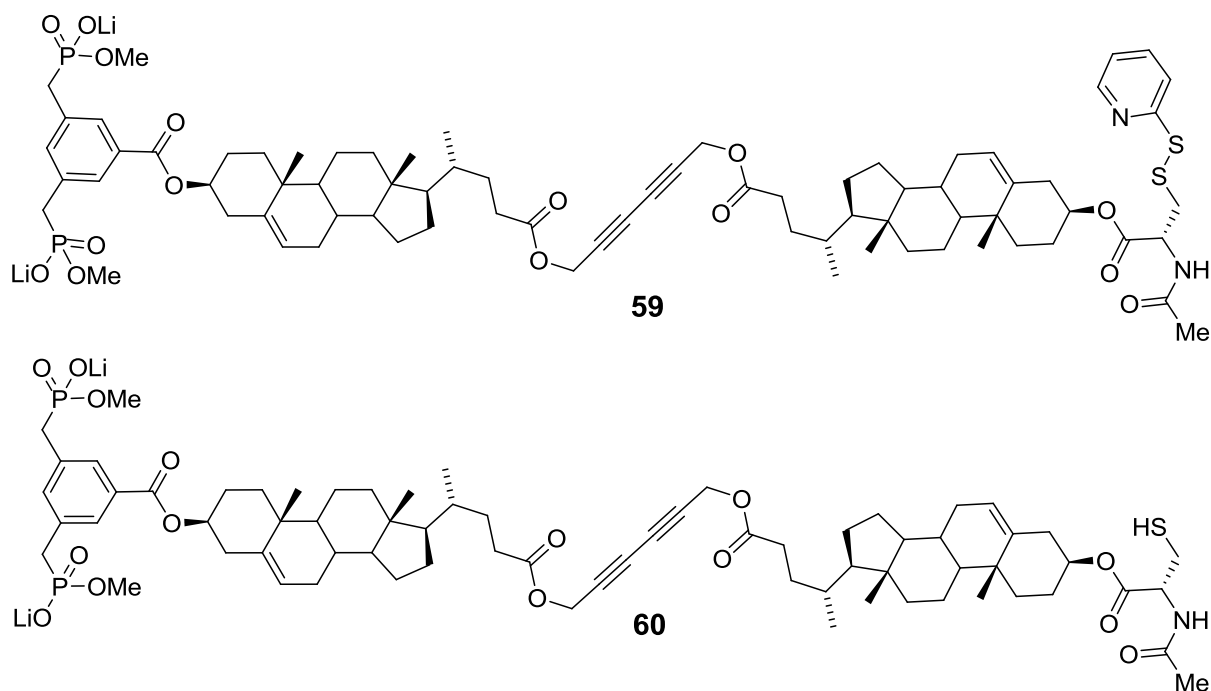


Abbildung 64: Transmembranbaustein 59 und 60 (2. Generation) nach Maue.^[174]

Um diesen Unsicherheitsfaktor ausschließen zu können, wurden die auf der flachen Cholensäure basierenden Transmembranbausteine **59** und **60** synthetisiert (Abbildung 64). Ferner wurde in diesem System ein *N*-Acetyl-geschütztes Cysteinderivat eingesetzt, um die Bildung unproduktiver Dimere (Abbildung 62) durch eine Bisphosphonat-Ammonium-Wechselwirkung zu verhindern. Jedoch konnte auch mit diesem System eine mögliche Signaltransduktion nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass, auch wenn das hochgesteckte Ziel der botenstoffinduzierten Signaltransduktion nicht erreicht wurde bzw. diese nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte, grundlegende Erkenntnisse im Bereich der Synthese von Transmembranbausteinen auf Lithochol- und Cholensäure-Basis und auf dem Gebiet der Planung und Durchführung von Signaltransduktionsexperimenten gesammelt wurden. Auf dieser Grundlage sollte die erfolgreiche Synthese und Untersuchung eines vereinfachten Systems möglich sein.

2 Aufgabenstellung

Die in Kapitel 1.6 vorgestellten Systeme zur künstlichen transmembranen Signaltransduktion von *Hunter et al.*^[143] und *Schrader et al.*^[174,175], sind die bisher einzigen publizierten Systeme, die so konzipiert wurden, dass sie, ausgelöst durch einen extrazellulären Stimulus, ein Signal aus dem extrazellulären Medium, über eine Doppelmembran hinweg, in das Innere einer Zelle weiterleiten können. Das von *Hunter et al.*^[143] vorgestellte System ist allerdings bezüglich der Reaktion auf ein extrazelluläres Signal nicht sehr spezifisch, da nahezu alle oxidativen Bedingungen zu einer Signalleitung führen (Abbildung 47). Das System von *Schrader et al.* ist mit Bisphosphonat- bzw. Boronsäure-Erkennungseinheiten funktionalisiert, die es ermöglichen, selektiv Adrenalin- bzw. Amin-induziert, ein Signal durch Abspaltung eines sekundären Botenstoffs (2-Thiopyridin) zu initiieren (Abbildung 56 und 64). Beide Systeme weisen allerdings eine schlechte Reproduzierbarkeit auf, so dass eine erfolgreiche Signaltransduktion nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte. Die bestehenden Konzepte und Ergebnisse sollen aufgegriffen werden und als Grundlage für Entwicklung eines Modellsystems zur botenstoff-induzierten Signaltransduktionssystems im Rahmen dieser Doktorarbeit dienen. Hierbei sollen Ergebnisse, Protokolle und Methoden auf ihre Anwendbarkeit überprüft werden und die auf molekularer Ebene ablaufenden Prozesse genauer untersucht werden.

Im ersten Schritt sollen zwei Transmembranrezeptoren synthetisiert werden, die als extrazelluläre Erkennungseinheiten mit den bereits hinlänglich bekannten Bisphosphonatpinzetten^[3,178,180,181] funktionalisiert sind. Im Gegensatz zu den bisher synthetisierten Systemen^[143,174] zur künstlichen transmembranen Signaltransduktion sollen die beiden anderen Enden der transmembranen Einheit nicht mit Reaktivgruppen funktionalisiert werden, sondern mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen, die ein FRET-Paar (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer) bilden. Als FRET-Paar soll das literaturbekannte Paar, bestehend aus Tryptophan (**61**) und Dansyl **62** verwendet werden (Abbildung 65).

Das Transmembransegment soll auf Steroid-Dimeren der Lithocholsäure (**63**) oder 3β -Hydroxy-5-cholensäure (**64**) basieren, die über eine Dialkin-Einheit verknüpft sind. Für eine hydrolysestabile Zentralregion soll der bisher verwendete Propargylalkohol (Abbildung 55 und 64) durch ein *N*-methyliertes Derivat ersetzt werden (Abbildung 65). Die Synthese der Rezeptoren soll modular erfolgen, so dass ein zentraler Gerüstbaustein **65** mit unterschiedlichen *second messengern* funktionalisiert werden kann. Zur Anknüpfung soll ein Glycin-Linker zum Einsatz kommen. Die resultierenden Zielstrukturen sind in Abbildung 66 dargestellt.

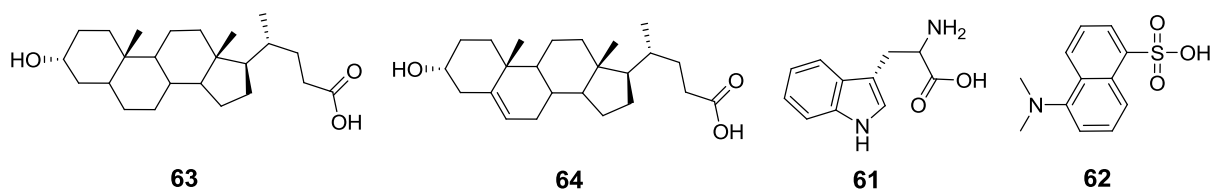


Abbildung 65: Grundgerüstbausteine 63 und 64 und vorgesehene Fluorophore Tryptophan (61) und Dansyl 62.

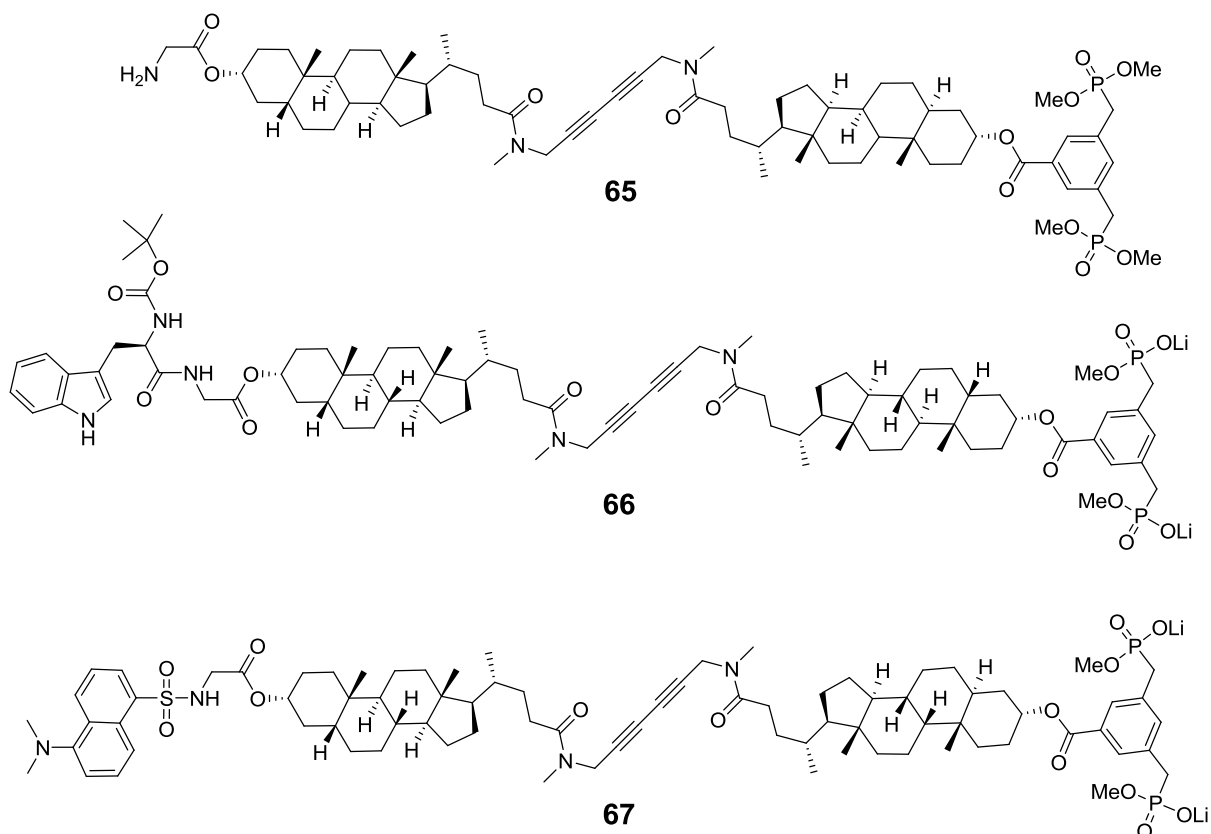


Abbildung 66: Zielmoleküle 66 und 67 sowie der Gerüstbaustein 65 auf Lithocholsäure-Basis.

Im Folgenden sollen die beiden Transmembranrezeptoren **66** und **67** in DPPC-Liposomen eingelagert und erste Signaltransduktionsexperimente durchgeführt werden. Durch extrazelluläre Komplexierung eines Triammoniumkations mit Hilfe der Bisphosphonatpinzetten, soll es im Komplex, vermittelt durch die starren Transmembransegmente, zur räumlichen Annäherung des FRET-Paares kommen. Die Verringerung des Abstandes zwischen Fluoreszenz-Donor und -Akzeptor soll wiederum einen Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) des Donors auf den Akzeptor auslösen (Abbildung 67). Dieser Energietransfer kann fluoreszenzspektroskopisch nachgewiesen werden.

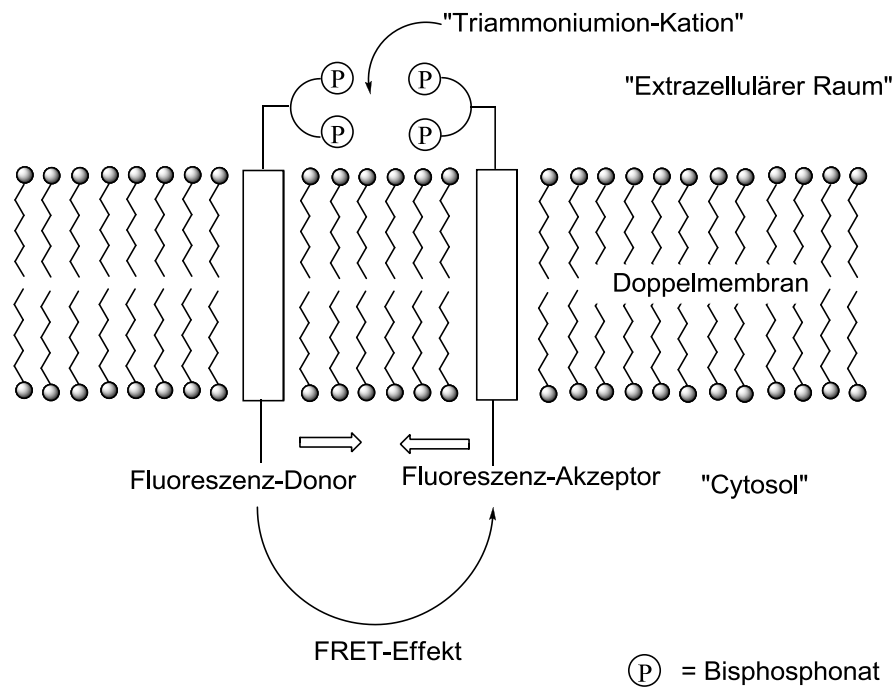


Abbildung 67: Schematische Darstellung der amin-induzierten transmembranen Signaltransduktion.

Mit Hilfe dieses vereinfachten, gegen eine frühzeitige Desaktivierung inerten Systems, sollen weitere Untersuchungen zur genauen Charakterisierung und Optimierung der Signalleitung durchgeführt werden. Ein Hauptaugenmerk besteht darin, die optimale Dotierung der Membran mit den Transmembranbausteinen **66** und **67** einzustellen, da bei der Verwendung eines FRET-Paares als *second messenger*, die Effizienz des detektierten FRET-Effekts direkt Aufschluss über die Bildung von produktiven ternären Komplexen, bestehend aus den beiden Transmembranrezeptoren **66** und **67** und dem Botenstoff, in der Membran gibt (Abbildung 67).

Durch weitere Experimente soll die Einlagerungsgeometrie der Transmembransegmente in der Membran untersucht werden, da es für die Einlagerung der Rezeptoren **66** und **67** zwei prinzipiell denkbare Anordnungen in der Membran gibt. Zu einen die gestreckte, membrandurchspannende und zum anderen die „U-förmige“ Einlagerung, bei der sich Erkennungseinheiten und Fluorophore eines Rezeptors auf derselben Seite der Membran befinden (Abbildung 68). Im Falle der „U-förmigen“-Einlagerung würde ebenfalls ein FRET-Effekt, induziert durch die Zugabe des Botenstoffs, detektierbar sein. Allerdings ist in dieser Anordnung nicht von einer Signaltransduktion zu sprechen, da die Signalweiterleitung auf der Membranaußenseite erfolgen würde. Um diesen Sachverhalt zu überprüfen, sollen geeignete Methoden und Experimente gefunden und entwickelt werden, da diese Beweisführung wohl die größte Schwierigkeit im Rahmen dieses Projektes darstellt.

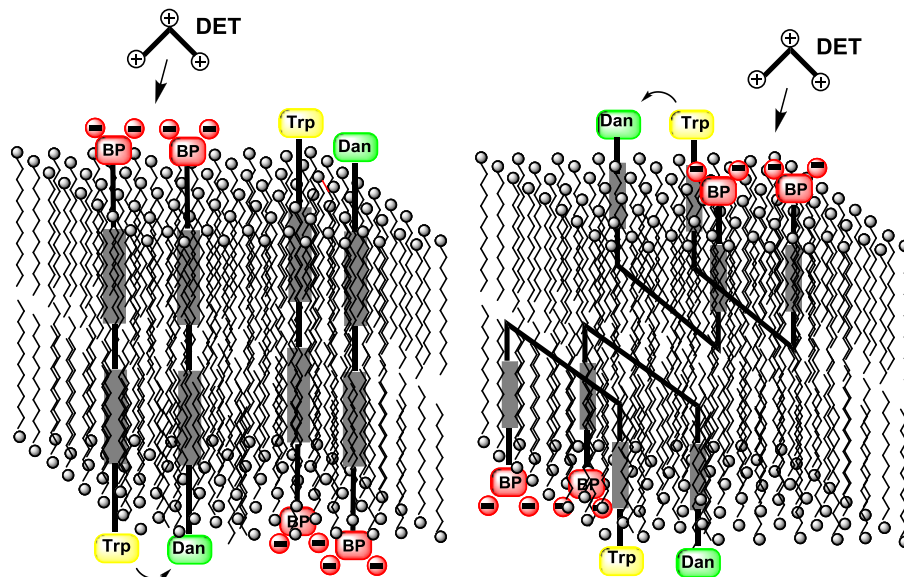


Abbildung 68: Mögliche Anordnungen der Transmembranrezeptoren 66 und 67 in einer Lipiddoppelschicht.

Durch die Entwicklung geeigneter Referenzexperimente sollen des Weiteren Sachverhalte, wie die Beweglichkeit der Rezeptoren im Liposom, eine eventuelle Membrangängigkeit der verwendeten Botenstoffe, welche wiederum zu einer nicht unidirektionalen Signalleitung führen würde, die Bestimmung der notwendigen Botenstoffkonzentration und die Verwendung biogener Botenstoffe, untersucht werden.

Nach erfolgreicher Etablierung des beschriebenen Modellsystems zur Botenstoff-induzierten Signaltransduktion sollen die Ergebnisse auf die bereits bekannten Systeme übertragen werden. Hierbei soll der Austausch der Fluorophore gegen einen „echten“ sekundären Botenstoffs erfolgen, da die Freisetzung eines sekundären Botenstoffs im intrazellulären Kompartiment, in Anlehnung an die Reaktion der menschlichen GPCR's und Rezeptor-Tyrosinkinasen ein erklärtes Fernziel darstellt. Denkbar ist, das von *Hunter*^[143] und *Maue*^[174-176] verwendete 2-Thiopyridin-System (Abbildung 56 und 64) wieder aufzugreifen und entweder die vorzeitige Reaktion des sekundären Botenstoffs durch geschickte Wahl der Bedingungen zu unterbinden oder eine Methode zu entwickeln, die die gezielte Aktivierung des Systems ermöglicht.

Hierzu ist der Einsatz einer Schutzgruppen denkbar, welche die Thiofunktion erst nach Vereinigung der Bausteine im fertigen Liposom freigibt. Literaturbekannt sind photolabile Nitrobenzyl- und Coumarin-Schutzgruppen, die, induziert durch einen kurzen Lichtblitz, Thiolgruppen quantitativ freisetzen können.^[213,214] Abbildung 69 zeigt die mögliche Anordnung eines photoaktivierbaren amin-induzierten Signaltransduktionssystems. Dieses System hat, ähnlich wie das FRET-System, den Vorteil, dass es während der Liposomenpräparation zu keiner vorzeitigen Abspaltung des sekundären Botenstoffs kommen kann.

Abbildung 69: Amin-induzierte transmembrane Signaltransduktion mit aktivierbarer *second messenger*-Einheit.

3 Durchführung und Ergebnisse

3.1 Moleküldesign und Retrosynthese

Aufbauend auf den Ergebnissen zur transmembranen Signaltransduktion von M. Maue^[174] und M. Ellermann^[215] sollte in dieser Arbeit ein vereinfachtes System zur amininduzierten transmembranen Signaltransduktion entwickelt werden. Die Systeme zur adrenalininduzierten Signaltransduktion wiesen einige grundlegende Probleme auf, die die Signaltransduktion selbst oder deren Detektion verhinderten.^[174,215] Das Design der Bausteine war so ausgelegt, dass sie an dem Ende, an dem die Reaktion erfolgen sollte, eine freie Ammoniumfunktion aufwiesen. Die freie Aminofunktion des Cysteinderivats begünstigt allerdings die Bildung von unproduktiven Dimeren, die anschließend für die Signaltransduktion nicht zur Verfügung stehen (Abbildung 70).

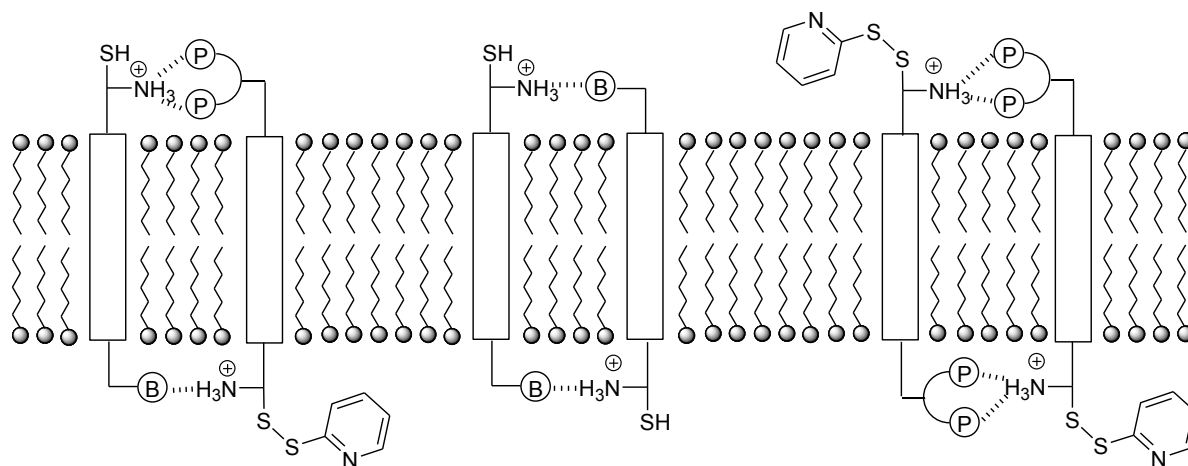


Abbildung 70: Unproduktive zyklische Komplexe im Liposom, die bei Anwesenheit freier Ammoniumgruppen auftreten können.

Um die Bildung dieser unproduktiven zyklischen Komplexe im Liposom zu minimieren, wurde auch hier schon versucht, Transmembranbausteine einzusetzen, die an beiden Bausteinen Bisphosphonatpinzetten als Erkennungseinheit trugen.^[174] Durch die, gegenüber der B-N-Bindung, geringere Bisphosphonat-Ammonium-Wechselwirkung sollten die unproduktiven Dimere weniger stabil sein. Außerdem ist zu erwarten, dass eine Clusterbildung aus drei Ammonium- und zwei Phosphat-Ionen zu erheblich stabileren Aggregaten führt, als die ditopische Erkennung eines Adrenalinmoleküls. Ein weiteres und sicherlich das größte Problem dieser Systeme ist die, aufgrund des zu geringen räumlichen Abstands, frühzeitig erfolgende Reaktion der Thiol- und der Disulfidfunktion während der Liposomenpräparation (Abbildung 71). Die Reaktion erfolgte bereits bei der Mischung mit dem Liposomenmatrixmaterial in Chloroform. Um die Bildung der unproduktiven Dimere und

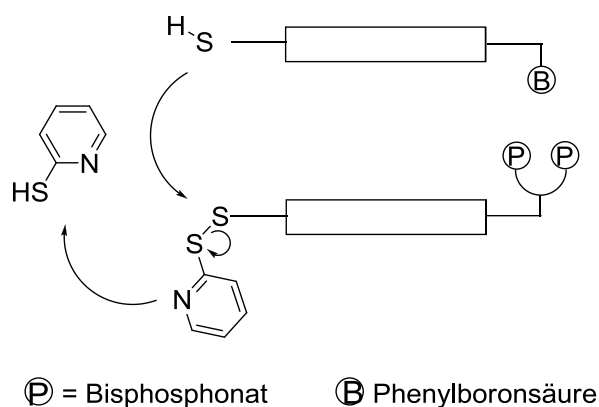


Abbildung 71: Abspaltung des sekundären Botenstoffs 2-Thiopyridin erfolgt bereits während der Liposomenpräparation ohne Zugabe von Adrenalin.

die vorzeitige Reaktion der Bausteine bei der Liposomenpräparation zu verhindern, sollten zwei Zielstrukturen entworfen werden, bei denen diese Nebeneffekte unterdrückt werden können. Als Erkennungseinheit soll in beiden Rezeptormolekülen die Bisphosphonatpinzette^[3,178,180,181,216] zum Einsatz kommen. Da diese jeweils zwei negative Ladungen trägt, sollten sich die Kopfgruppen nach der Einlagerung in die Doppelmembran abstoßen und so die beiden Rezeptorbausteine auf einen größeren räumlichen Abstand bringen (Abbildung 72).

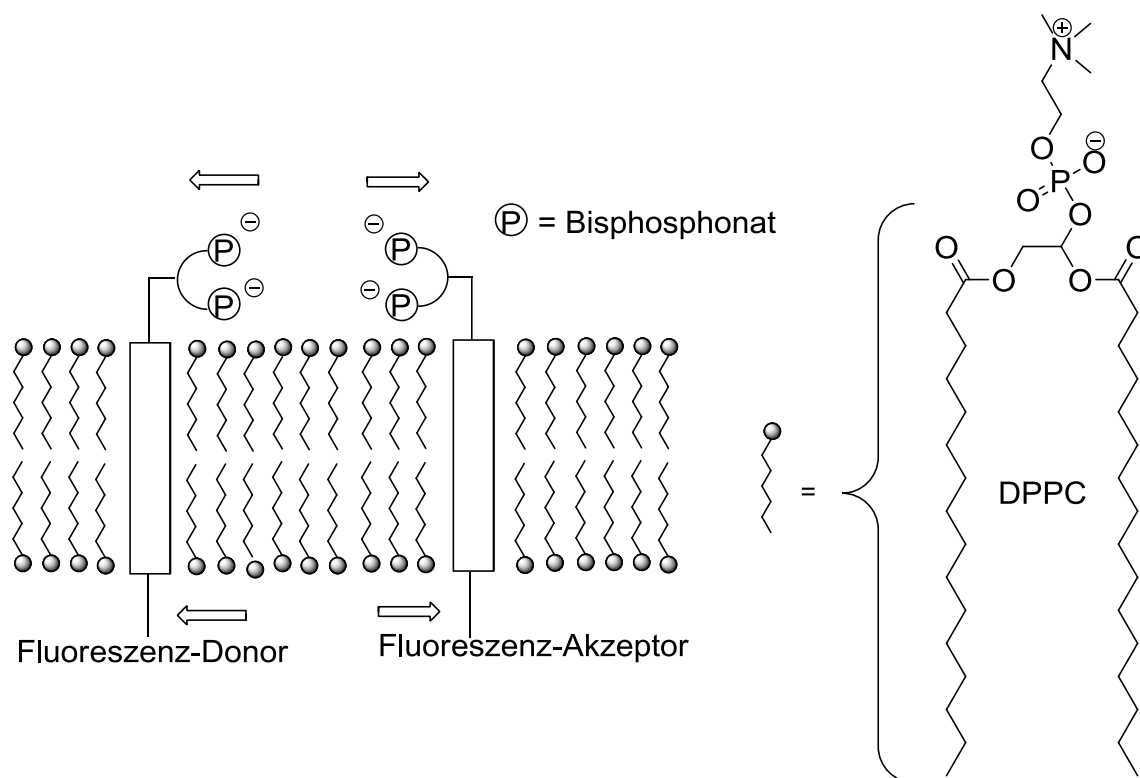


Abbildung 72: Abstoßende Bisphosphonat-Bisphosphonat-Wechselwirkung bei der Liposomenpräparation.

Für den Aufbau des Transmembransegments gibt es zwei bekannte Alternativen. Entweder soll ein Steroiddimer auf Basis der 3β -Hydroxy-5-cholensäure (**64**) in Anlehnung an das von Hunter^[143] veröffentlichte System oder ein Lithocholsäuredimer zum Einsatz

kommen, wie es *M. Maue*^[174] in seinem System verwendete. Die Cholensäure **64** besitzt aufgrund ihres flachen und starren Steroidgerüsts eine optimale Geometrie für die Einlagerung in eine Doppelmembran. Die Lithocholsäure (**63**) weist durch die *cis*-dekalinische Verknüpfung von A- und B-Ring des Steroidgerüsts einen 90°-Knick auf. Wie von *Kikuchi*^[139-141] bereits gezeigt werden konnte, behindert die veränderte Geometrie (Abbildung 73) die gerichtete Einlagerung in Liposomen aber nicht. Von *M. Maue* konnte ebenfalls gezeigt wer-

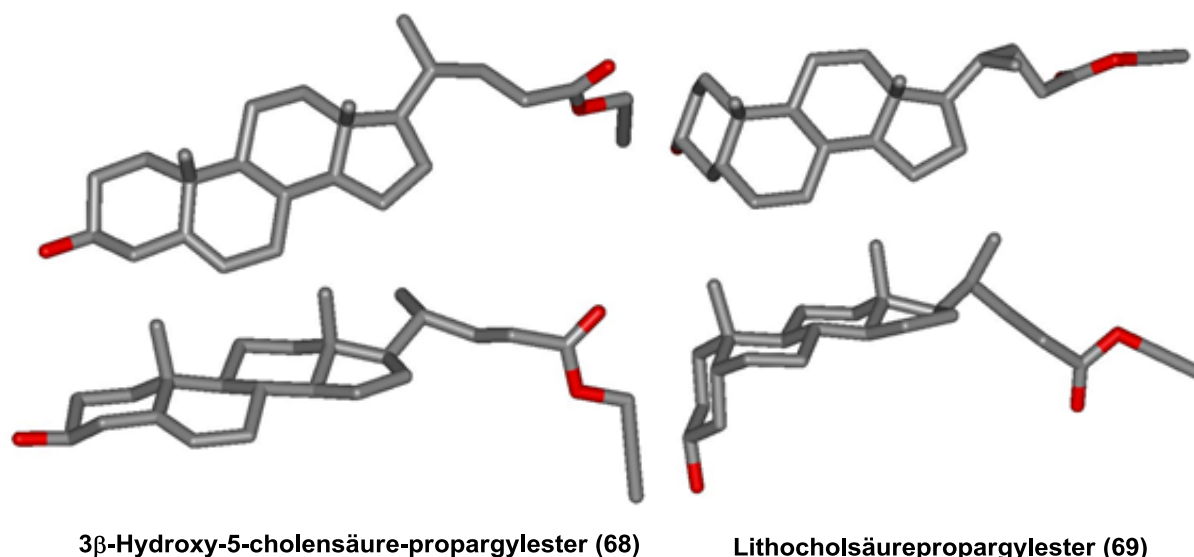


Abbildung 73: Energieminimierte Strukturen der beiden Steroidmoleküle. *links:* 3β-Hydroxy-5-cholensäure-propargylester (68); *rechts:* Lithocholsäurepropargylester (69) [Macromodel 7.2 Amber*, in Wasser, 1000 Schritte].^[174]

den, dass die verkürzte Länge des Lithocholsäuredimers (29 Å) im Gegensatz zum 3β-Hydroxy-5-cholensäuredimer (33 Å) die Einlagerung in DPPC-Liposomen nicht behindert.^[174] Der Kopf-zu-Kopf-Abstand einer im Gelzustand befindlichen DPPC-Doppelmembran beträgt 36 Å, im fluiden Zustand beträgt die Schichtdicke der Membran 41 Å.^[217] Durch die Verwendung von Linkern zur Anknüpfung der Erkennungseinheiten und der *second messenger*-Funktionen sollte, unter Verwendung des Lithocholsäure-Dimers, eine annähernd optimale Moleküllänge erreicht werden. Aufgrund dieser Erkenntnisse stellt die Lithocholsäure eine echte und deutlich kostengünstigere Alternative zur 3β-Hydroxy-5-cholensäure (**64**) dar, da diese fast viermal so teuer ist. Die dreistufige Synthese der 3β-Hydroxy-5-cholensäure (**64**), ausgehend von Hyodeoxycholsäure, würde der linearen, und auf dem Baukastenprinzip basierenden Syntheseroute, entgegenstehen.

Die grundlegendste Veränderung zu den bisher bekannten Systemen soll der Austausch der Thiol- bzw. 2-Thiopyridindisulfidfunktion gegen zwei Fluoreszenzfarbstoffe sein. Diese beiden Farbstoffe sollen ein FRET-Paar bilden. Die Signalweiterleitung über die Doppelmembran kann somit über einen FRET-Effekt (**F**luoreszenz-**R**esonanz-**E**nergie-**T**ransfer) detektiert werden. Der Ersatz der Reaktivgruppen soll vor allem die Präparation der DPPC-

Liposomen erleichtern, da die vorzeitige Abspaltung des sekundären Botenstoffs erst gar nicht stattfinden kann. Auch die Detektion sollte im Gegensatz zu den Rezeptoren mit Reaktivgruppen deutlich empfindlicher sein, da nach der Einlagerung noch der gesamte „sekundäre Botenstoff“ zur Verfügung steht. Als Fluorophore soll das wohl bekannteste und am besten untersuchte FRET-Paar Tryptophan/Dansyl verwendet werden. Die Anregungswellenlänge des Tryptophans liegt bei 280 nm, die Emissionwellenlänge bei 330 nm. Der FRET-Akzeptor Dansyl (*N,N*-Dimethylnaphthalinsulfonsäure) absorbiert bei 330 nm und emittiert bei 520 nm. Die, aus diesen Überlegungen resultierenden Zielstrukturen, sind in Abbildung 74 dargestellt. Die Fluorophore sollen über einen ein Glycinester als Linker an das Steroidgrundgerüst angeknüpft werden. Für eine hydrolysestabile Zentralregion soll der bereits bekannte Propargylester **69** gegen ein *N*-Methylpropargylamid ausgetauscht werden. Für das nicht methylierte Propargylamid hatte sich bereits gezeigt, dass es in Chloroform unlöslich und somit für die Liposomenpräparation nicht geeignet ist.^[174] Die bereits erfolgreich verwendete Bisphosphonat-Erkennungseinheit soll unverändert bleiben.^[3,178,180,181,216]

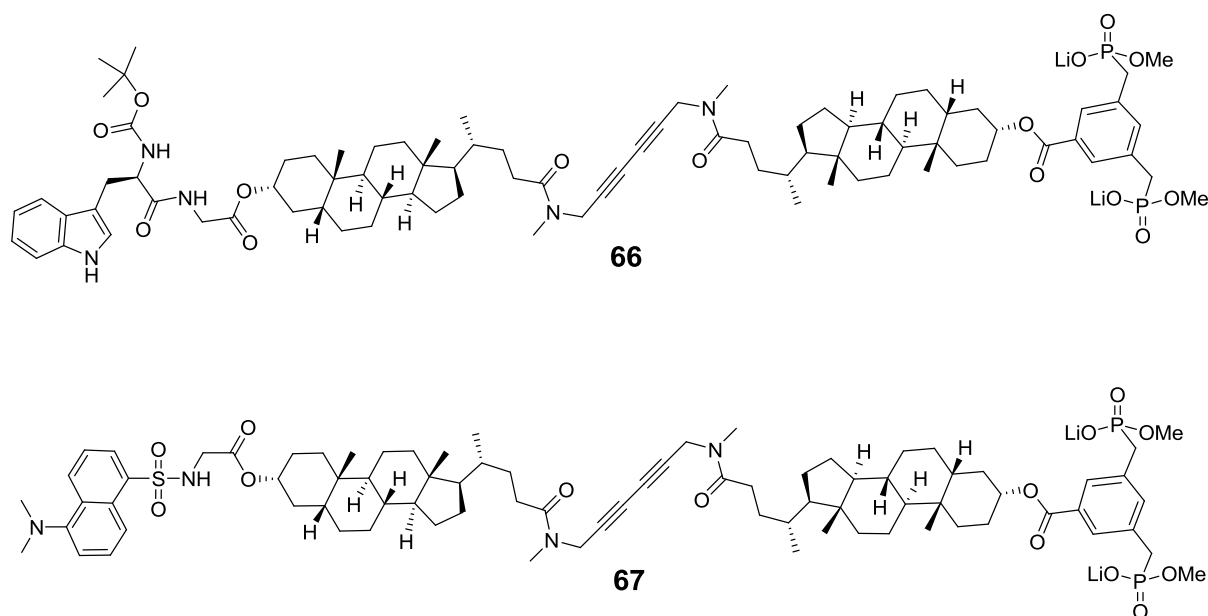


Abbildung 74: Lewisstruktur der Transmembranbausteine 66 und 67.

Aus retrosynthetischer Sicht lassen sich die beiden transmembranen Rezeptorbausteine **66** und **67** modular aufbauen, da sie bis auf den Fluorophor, auf dem gleichen Grundgerüst (**65**) basieren. Die Forderung nach einer möglichst einfach zu funktionalisierenden transmembranen Zentralregion, die den schnellen Zugang zu neuen Systemen zur Erkennung anderer Botenstoffe, aber auch zu Freisetzung anderer *second messenger* ermöglicht, wurde somit berücksichtigt. Damit ergeben sich für die Syntheseplanung sechs wichtige Schnittpunkte (Abbildung 75):

1. Die Spaltung des Phosphonsäure-Methylesters soll im letzten Schritt mittels LiBr durchgeführt werden.
2. Die Anknüpfung der FRET-Bausteine soll im Fall des Tryptophans über eine Peptidkupplung, für den Dansylrest über ein Sulfonamid erfolgen.
3. Die beiden Acetylenbausteine sollen über eine Kupfer(I)-vermittelte *Glaser-Hay*-Reaktion zum Dimer gekuppelt werden.
- 4./5. Für die Einführung des Glycin-Linkers und der Bisphosphonateinheit ist ein Veresterungsprotokoll vorgesehen.
6. Die Derivatisierung der Lithocholsäure mit *N*-Methylpropargylamin soll ebenfalls über eine Amidknüpfung erfolgen.

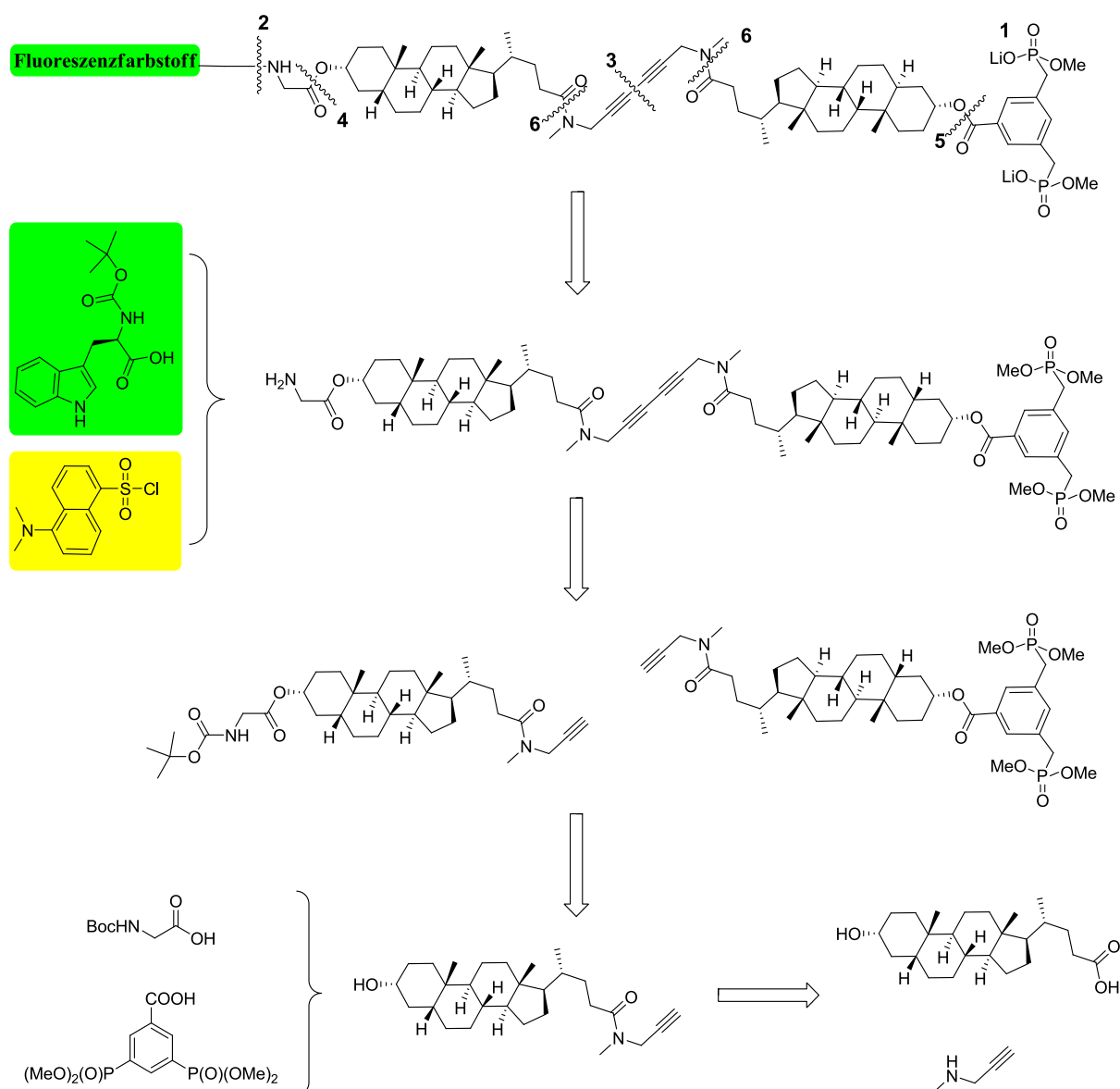


Abbildung 75: Retrosynthese der Transmembranbausteine 66 und 67.

3.2 Synthese der Rezeptoren 66 und 67

3.2.1 Synthese des Gerüstbausteins 65

Im ersten Schritt der Synthese des Gerüstbausteins **65** wurde kommerziell erhältliche Lithocholsäure (**63**) mit *N*-Methylpropargylamin (**70**) gekuppelt. Hierzu wurde nach einem bereits ausgearbeiteten Protokoll DCC unter zusätzlicher Verwendung von 4-DMAP eingesetzt.^[174] Die Dimerisierung der Lithocholsäure (**63**) konnte durch einen Überschuss an *N*-Methylpropargylamin (**70**) und langsames Zutropfen des Kupplungsreagenz DCC weitgehend unterdrückt werden, da die Konzentration an aktivierter Säure sehr gering gehalten werden kann. Diese Synthese konnte im zweistelligen Grammmaßstab etabliert werden.

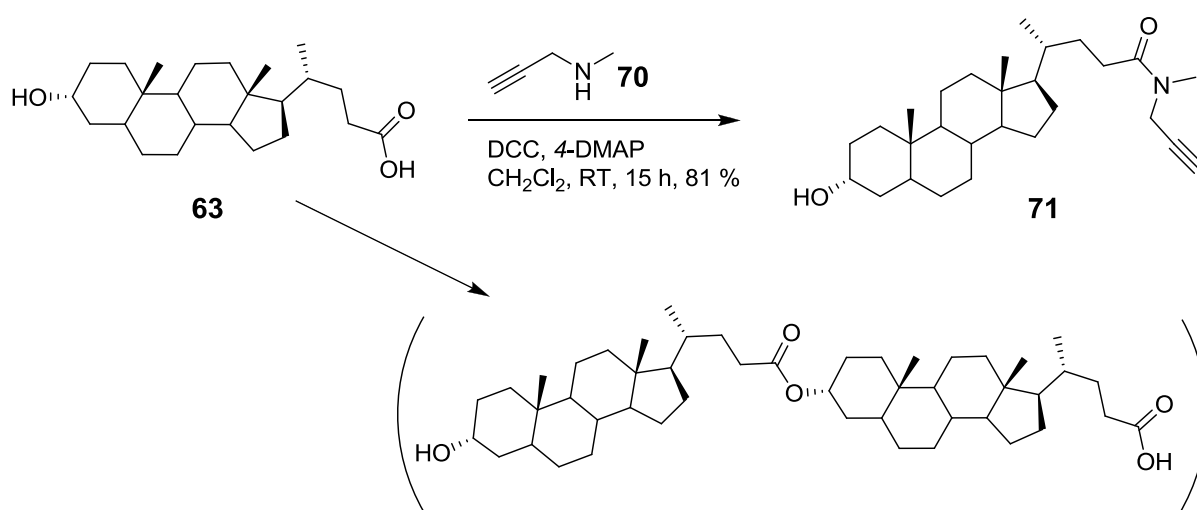


Abbildung 76: Synthese von Lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid (**71**).

Zum Aufbau des transmembranen Gerüsts wurde die Derivatisierung von Lithocholsäure (**63**) mit *N*-Methylpropargylamin (**70**) gewählt, da sich in ersten Testreaktionen zeigte, dass diese Derivate, im Gegensatz zu den Veresterungsprodukten mit Propargylalkohol erheblich einfacher zu reinigen sind. Das erhaltene Lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid (**71**) wurde ausführlich NMR-spektroskopisch untersucht, um in den folgenden Synthesen, bei stark ansteigendem Molekulargewicht, eine leichtere Zuordnung der Signale zu ermöglichen. Abbildung 77 zeigt einen Ausschnitt aus dem ¹H-NMR-Spektrum von **71**. Es ist zu erkennen, dass für die rotmarkierten Gruppen im sekundären Propargylamid doppelte Signalsätze vorliegen. Diese sind auf die *cis/trans*-Amid-Isomerie am Carbonylkohlenstoff (C25) zurückzuführen. Aus dem Vergleich der Signale ist zu schließen, dass die Isomere in einem Verhältnis von ungefähr 2:1 vorliegen. Über die angefertigten *H,H*-COSY-, bzw. *H,H*-NOESY-Spektren konnte leider nicht eindeutig zugeordnet werden, welches Isomer zu welchem Anteil vorliegt. Die Zuordnung der entsprechenden Kohlenstoffsignale erfolgte über das HMQC-Spektrum (Abbildung 78).

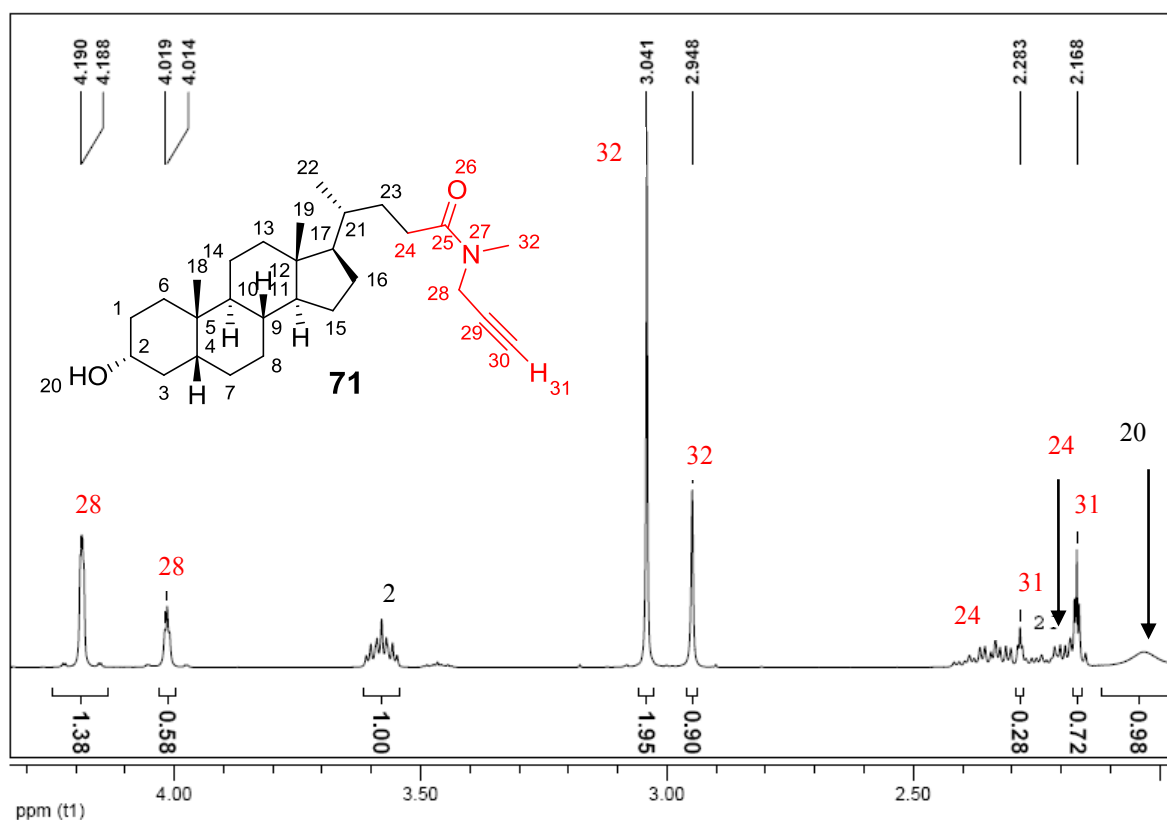


Abbildung 77: Ausschnitt aus dem ^1H -NMR-Spektrum von Lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid (71).

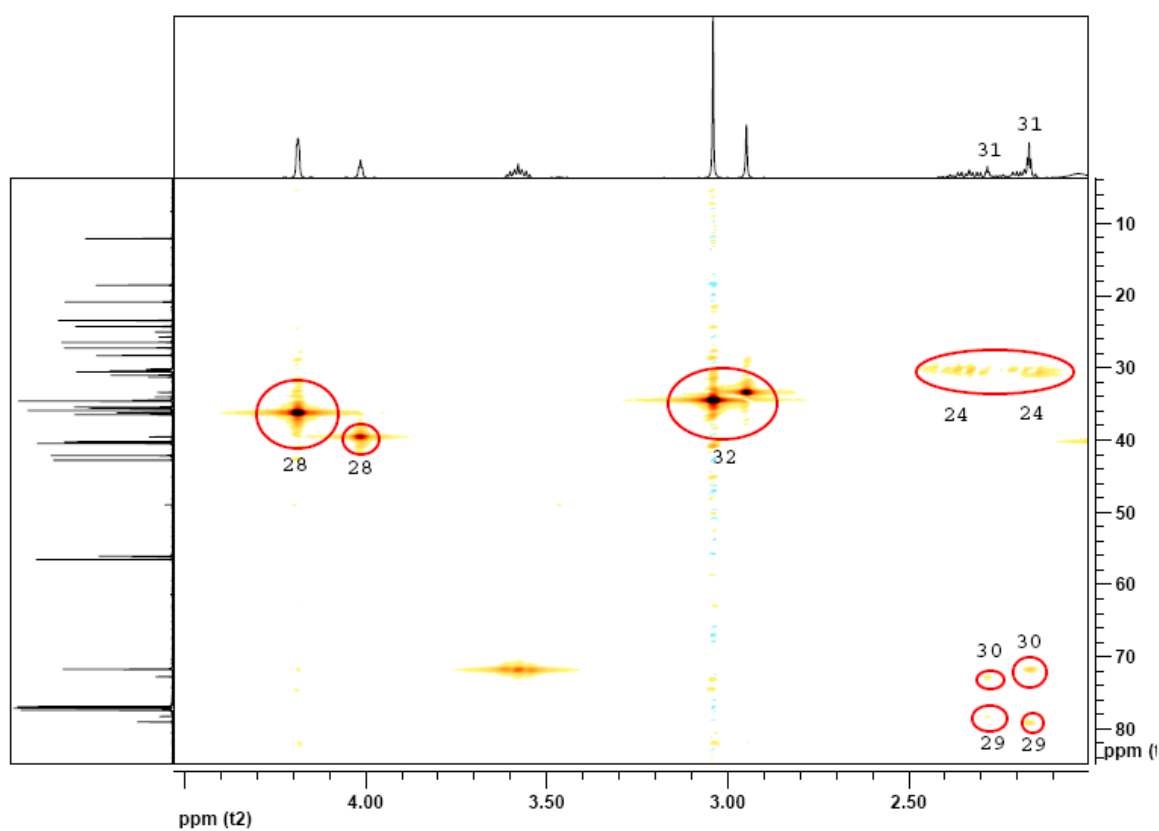


Abbildung 78: Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum von Lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid (71).

Über ^{13}C -Spektren, in Verbindung mit DEPT 90- und DEPT 135-Experimenten und dem Vergleich mit Literaturdaten, konnten alle Kohlenstoffsignale zugeordnet werden.^[174] Mit Hilfe der 2D-NMR-Spektren ließen sich zudem die meisten der Protonensignale interpretieren. Es existieren für fast alle im Folgenden hergestellten Verbindungen umfangreiche NMR-spektroskopische Daten.

Für die Darstellung des Boc-geschützten Glycinbausteins **72** wurde *N*-Boc-geschütztes Glycin mit Lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid (**71**) HCTU-vermittelt verestert. Die Synthese des Bausteins **72** lieferte hohe Ausbeuten, so dass die Synthese im

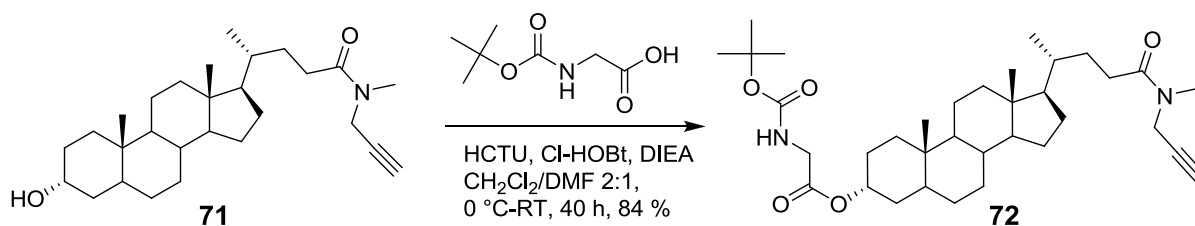


Abbildung 79: Synthese von *N*-Boc-glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid **72**.

Grammmaßstab etabliert werden konnte. Nachfolgend wurde in einer Testreaktion die Boc-Schutzgruppe in einem Gemisch aus Dichlormethan und Trifluoressigsäure abgespalten. Die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe erfolgte quantitativ mit sehr kurzen Reaktionszeiten.

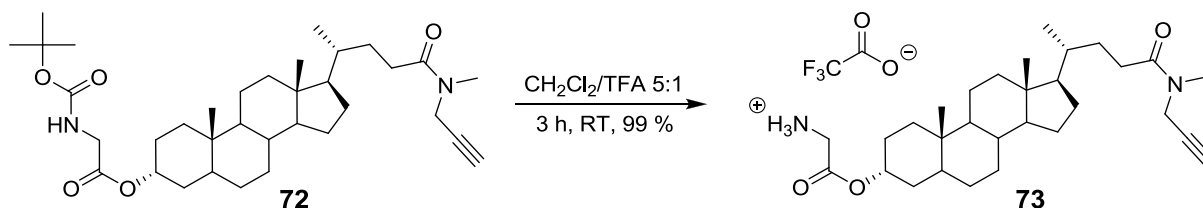


Abbildung 80: Entschützung des Bausteins **72**.

Dies war sehr erfreulich, da diese Reaktion den Schlüsselschritt zur weiteren Funktionalisierung des Gerüstbausteins **65** darstellt.

In der nächsten Reaktionssequenz wurde Lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid (**71**) mit 3,5-Bis-(dimethylphosphorylmethyl)benzoesäure (**74**) (vierstufige Synthese ausgehend von Mesitylen) umgesetzt. In einem ersten Ansatz wurde versucht, die Kupplung mit DIC/HOBt durchzuführen. Diese lieferte allerdings Umsätze von nur ~20 %. Unter abermaliger Verwendung von HCTU/Cl-HOBt konnten Ausbeuten von 60 % erreicht werden. Die Umsätze waren mit HCTU/Cl-HOBt deutlich höher. Allerdings war das Produkt säulenchromatographisch nur sehr schwer von Resten der Kupplungsreagenzien zu trennen. Nach längerer Optimierung konnten zuerst die Kupplungsreagenzien in reinem Ethylacetat abgetrennt werden. Danach wurde die mobile Phase auf Dichlormethan : Methanol = 30:1 umgestellt und über eine Gradienten-Säule schließlich das Produkt mit Dichlormethan : Me-

thanol = 9:1 isoliert. Die Ausbeute konnte so auf 79 % gesteigert werden. An der Verbindung **75** wurden in einer weiteren Testreaktion zwei der vier Phosphonsäuremethylester mit Lithiumbromid gespalten, um im Vorfeld zu überprüfen, ob der letzte Schritt der mehrstu-

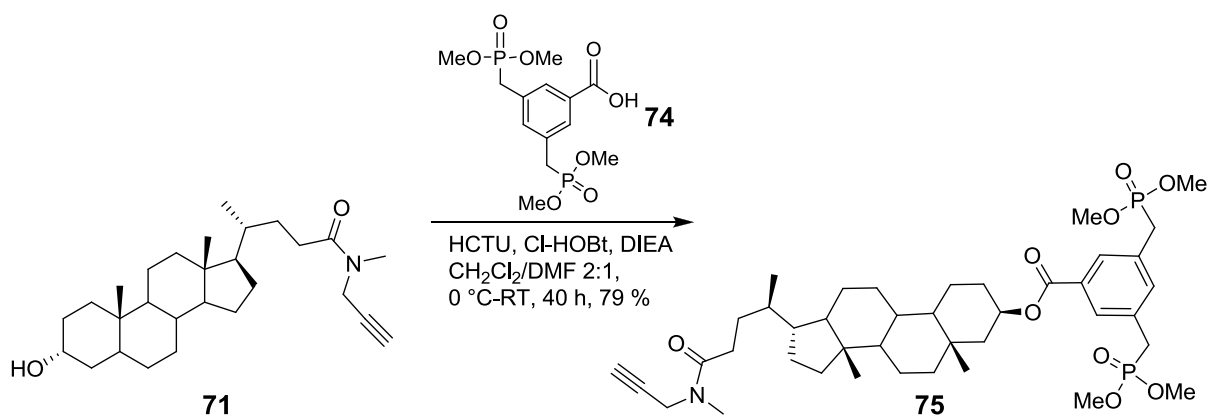


Abbildung 81: Synthese des Bisphosphonatbausteins **75**.

figen Synthese auch mit dem Steroid-Derivaten der 3,5-Bis-(dimethylphosphorylmethyl)-benzoesäure (**74**) durchführbar ist. Die Methylester-Spaltung lieferte den Baustein **76** in quantitativen Umsätzen.

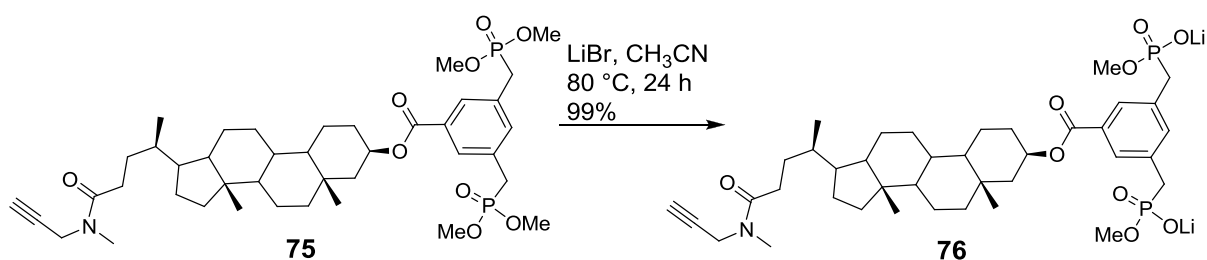


Abbildung 82: LiBr-Spaltung des 3,5-Bis-(dimethylphosphorylmethyl)-benzoesäure-Derivats **75**.

Als nächstes sollten die neuen Lithocholsäure-*N*-methylpropargylamidderivate **72** und **75** dimerisiert werden. Aus den Synthesen der Transmembranrezeptoren zur adrenalin-induzierten Signaltransduktion^[174] war bekannt, dass die gerichtete Heterodimerisierung unter *Cadiot-Chodkiewicz*-Bedingungen^[218-220], bei Verwendung eines iodierten Acetylderivats, nicht zur Bildung der gewünschten Dimere führte. Unter diesen Bedingungen wurde ausschließlich das nicht iodierte Acetylderivat dimerisiert. Aus diesem Grund wurde die Dialkinkupplung mittels statistischer *Glaser-Hay*-Kupplung durchgeführt.^[221] Diese Cu(I)-vermittelte Kupplung führt normalerweise zu einer ungerichteten Dimerisierung, so dass für das gewünschte Heterodimer **77** eine maximale Ausbeute von 33 % zu erwarten ist. Durch eine geänderte Reaktionsführung kann die Ausbeute jedoch bis auf maximal 65 % gesteigert werden. Hierzu werden die beiden Acetylenbausteine **72** und **75** nicht in einem Verhältnis von 1:1 eingesetzt, sondern ein zweifacher Überschuss des Glycinderivats **72** verwendet. Der Einsatz von zwei Äquivalenten des Glycinbausteins **72** war durchaus vorteilhaft, da dieser in

einer zweistufigen Synthese in hohen Ausbeuten hergestellt werden kann. Der Bisphosphonatbaustein **75** muss hingegen in einer längeren Synthese (sechs Stufen), mit anschließender aufwändiger Reinigung hergestellt werden und kann nach der Dimerisierung nicht

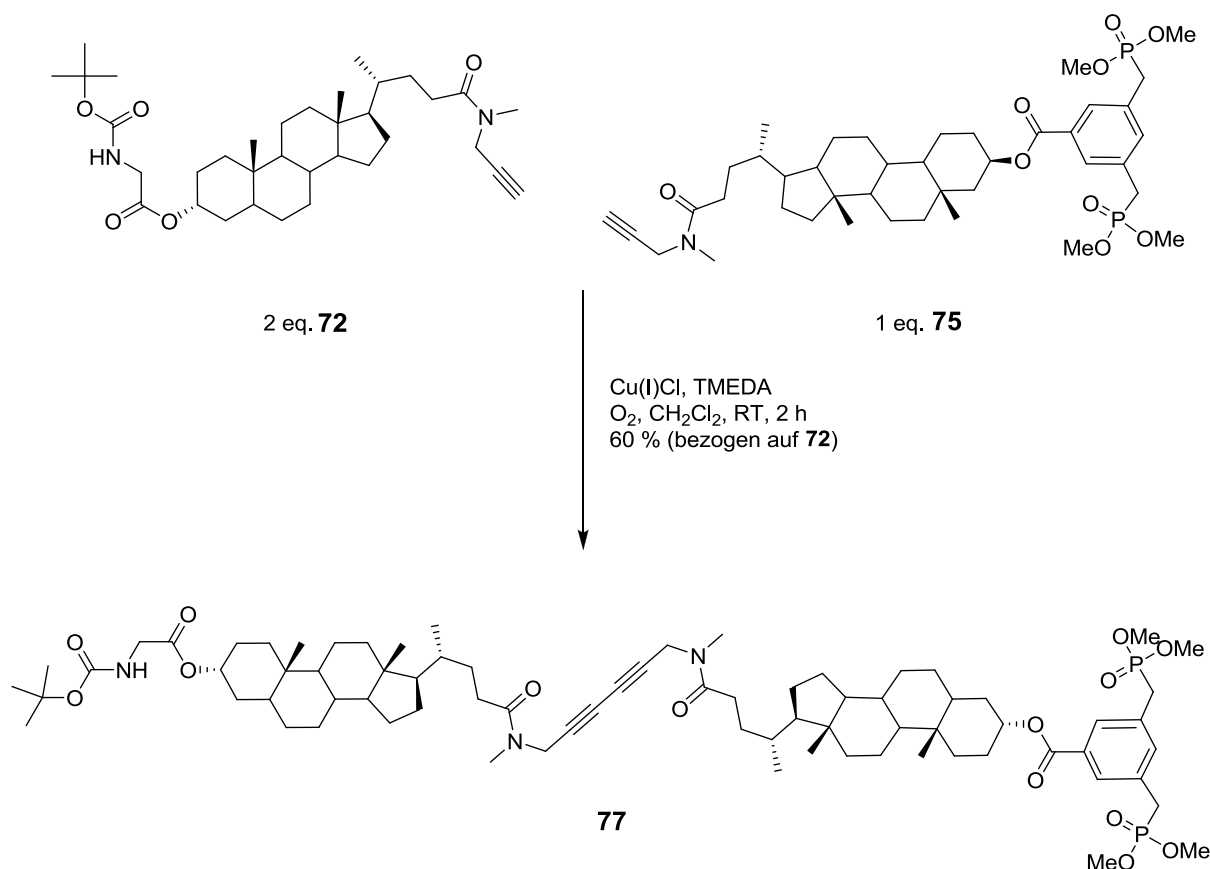


Abbildung 83: Statistische gekreuzte Glaser-Hay-Kupplung der Bausteine **72** und **75**.

zurückgewonnen werden. Dazu besitzt diese Reaktion einen entscheidenden Vorteil. Die vollständige Umsetzung der Edukte zu den drei möglichen Dimeren war, ohne Spuren von Edukten, bereits nach zwei Stunden zu beobachten. Aufgrund der großen Polaritätsunterschiede der drei Dimere waren diese anschließend durch einfache säulenchromatographische Aufreinigung gut voneinander zu trennen und das gewünschte Dimer **77** konnte mit einer Ausbeute von 60 % isoliert werden.

Der endgültige Gerüstbaustein **65** konnte durch die bereits oben angeführte Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mit quantitativem Umsatz erhalten werden. Über die freie Aminofunktion des Glycin-Linkers sollte in den nächsten Reaktionsschritten die Anknüpfung der Dansyl- bzw. Tryptophaneinheiten möglich sein. An dem Gerüstbaustein **77** wurden ebenfalls LiBr-vermittelt die Phosphosphonsäuremethylester gespalten. Die Umsetzung zum Baustein **78** verlief ebenfalls quantitativ. Des Weiteren wurde **78** N-terminal Boc-entschützt. Die, mit einem Umsatz von 99 % erhaltene Verbindung **79** soll später für Referenzmessungen verwendet werden.

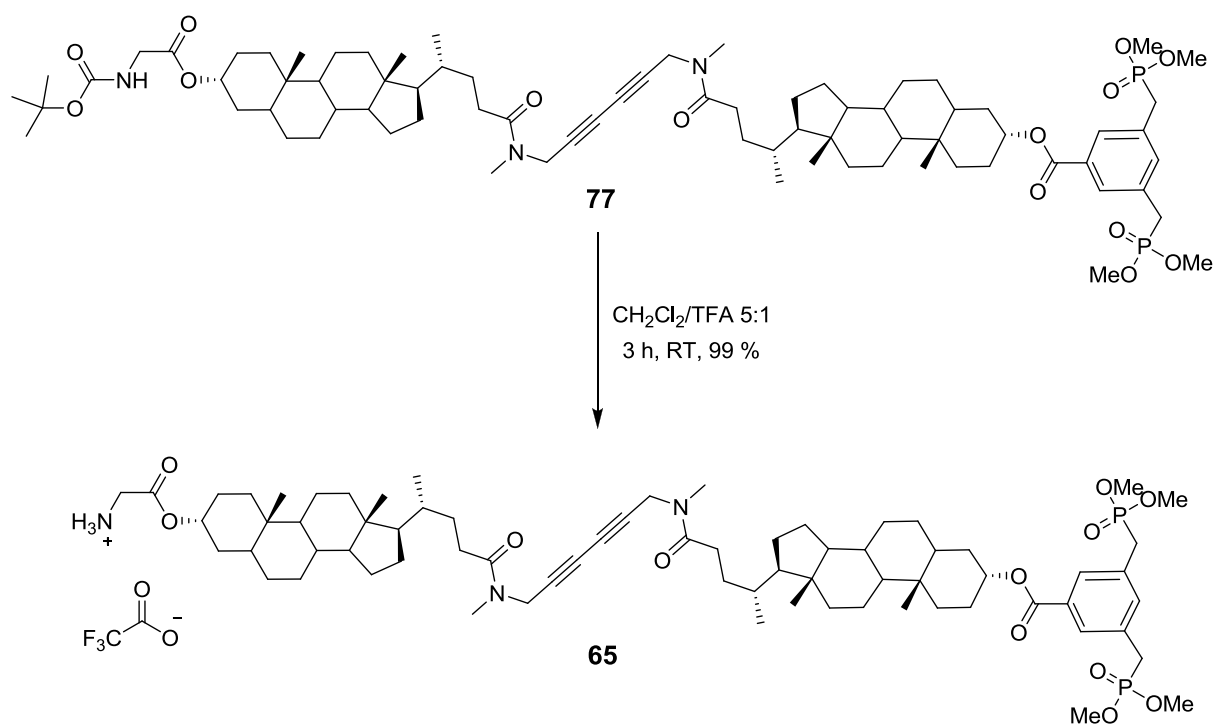


Abbildung 84: Abspaltung der Boc-Schutzgruppe/Entschützung des transmembranen Gerüstbaustein **77**.

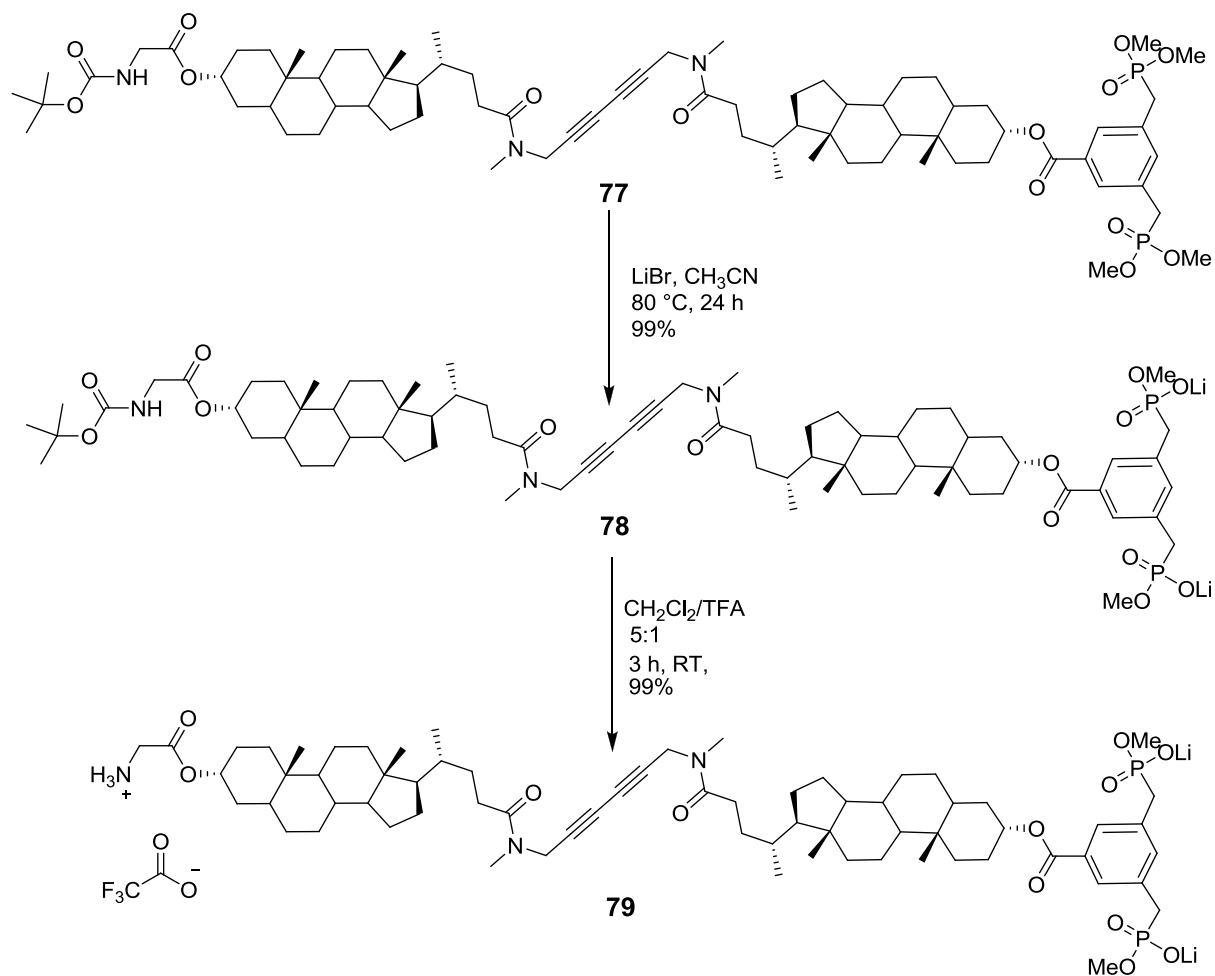


Abbildung 85: Synthese der Modellgerüstbausteine **78** und **79**.

3.2.2 Synthese des Rezeptors 83 mit Tryptophan-Donoreinheit

Im Folgenden sollte an die Gerüsteinheit **65** *N*-Boc-geschütztes Tryptophan über eine Peptidkupplung angebunden werden. Hierzu wurde HCTU in Verbindung mit Cl-HOBt/DIEA eingesetzt. Allerdings führte die Reaktion nicht zum gewünschten Produkt. Es konnte die Bildung mehrerer Nebenprodukte beobachtet werden. Um die mögliche Bildung

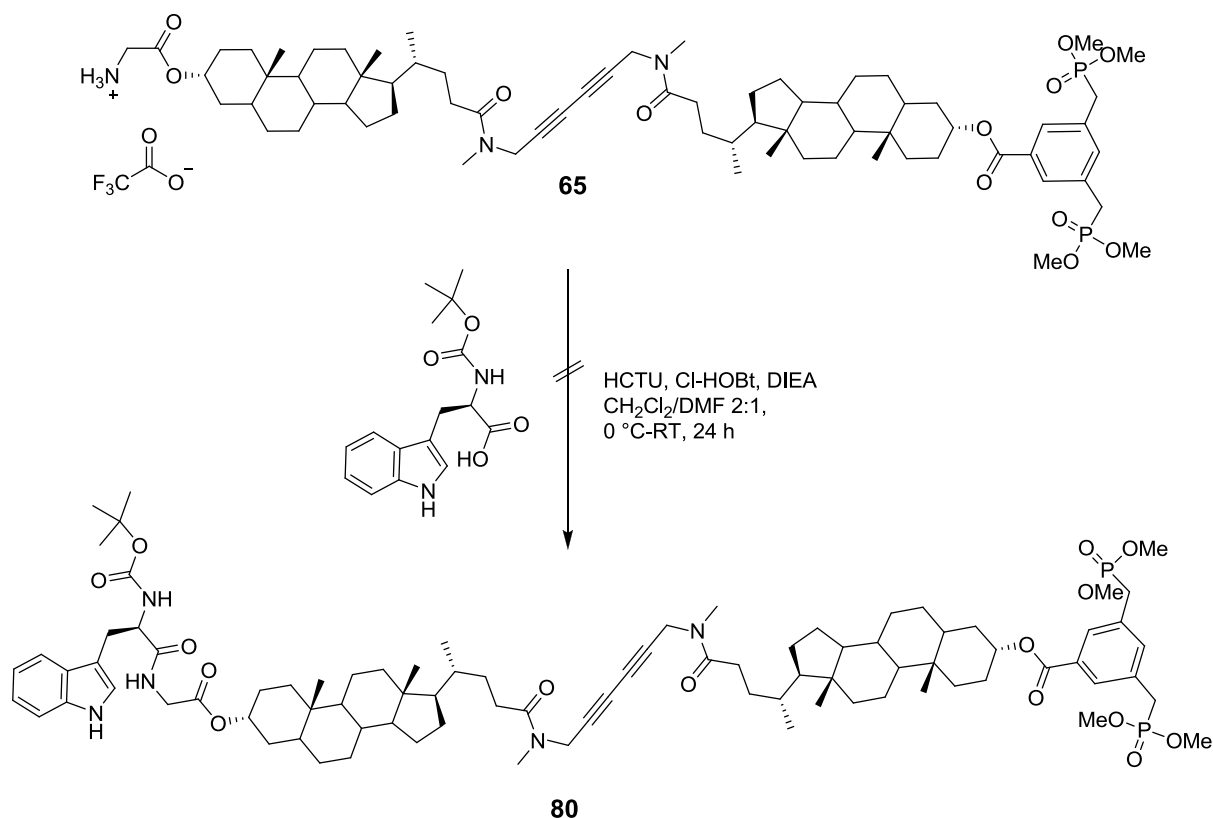


Abbildung 86: Synthese des Bausteins 80 mit *N*-Boc-geschützter Tryptophaneinheit.

eines Dipeptids, bestehend aus zwei, über das heterocyclische Stickstoffatom verknüpften Tryptophanmolekülen zu unterdrücken, wurde eine Reaktionssequenz gewählt, die bereits bei der Synthese des Lithocholsäure-*N*-methylpropargylamids (**71**) zum Einsatz kam. Hierzu wurden das *N*-Boc-tryptophan und das Transmembransegment **65** vorgelegt und über einen Zeitraum von drei Stunden langsam DCC zugetropft. Auch bei dieser Reaktion konnte das gewünschte Produkt überraschenderweise nur mit einem Umsatz von 5 % erhalten werden. Ein weiterer Grund für die ausbleibende Reaktion könnte im sterischen Anspruch des Bausteins **65** begründet sein. In diesem Fall müsste die gesamte Reaktionsfolge geändert werden.

Um das Problem der Dipeptidbildung zu umgehen, musste das heterozyklische Stickstoffatom mit einer Schutzgruppe versehen werden. Diese sollte nach Möglichkeit im nächsten Schritt leicht entfernt werden können. Für das vorliegende System ist die Auswahl an Schutzgruppen allerdings limitiert. Unter der Voraussetzung, dass die Schutzgruppe am primären Amin des Tryptophans aus bereits erläuterten Gründen im Molekül verbleiben

sollte und zudem selbst nicht fluoreszenzaktiv sein darf, schied kommerziell erhältliches *N*-Fmoc-(Boc)-tryptophan aus. Die Verwendung einer Acetyl- oder *Z*-Schutzgruppe am primären Amin und einer Boc-Schutzgruppe am heterozyklischen Stickstoffatom hätte zu diesem Zeitpunkt einen deutlich höheren synthetischen Mehraufwand bedeutet, so dass eine einfachere Syntheseroute gewählt wurde, um einen schnellen Zugang zu einer Fluoreszenz-Donor-Einheit zu bekommen und erste Experimente in Liposomen durchführen zu können.

So wurde auf kommerziell erhältliches, zweifaches Boc-geschütztes Tryptophan zurückgegriffen. Die Überlegung hierbei war, die labilere heterozyklische Boc-Schutzgruppe mit einer geschickt gewählten Reaktionssequenz unter Verbleib der Zweiten aus dem Molekül zu entfernen. Zum Anderen bestand die Möglichkeit beide Schutzgruppen im Molekül zu belassen. Analog zur bereits oben beschriebenen Reaktionsführung wurde mit HCTU/Cl-HOBt gekuppelt. Überraschenderweise konnte die Zielverbindung **81** mit über 95 % Ausbeute, durch einfache chromatographische Reinigung isoliert werden.

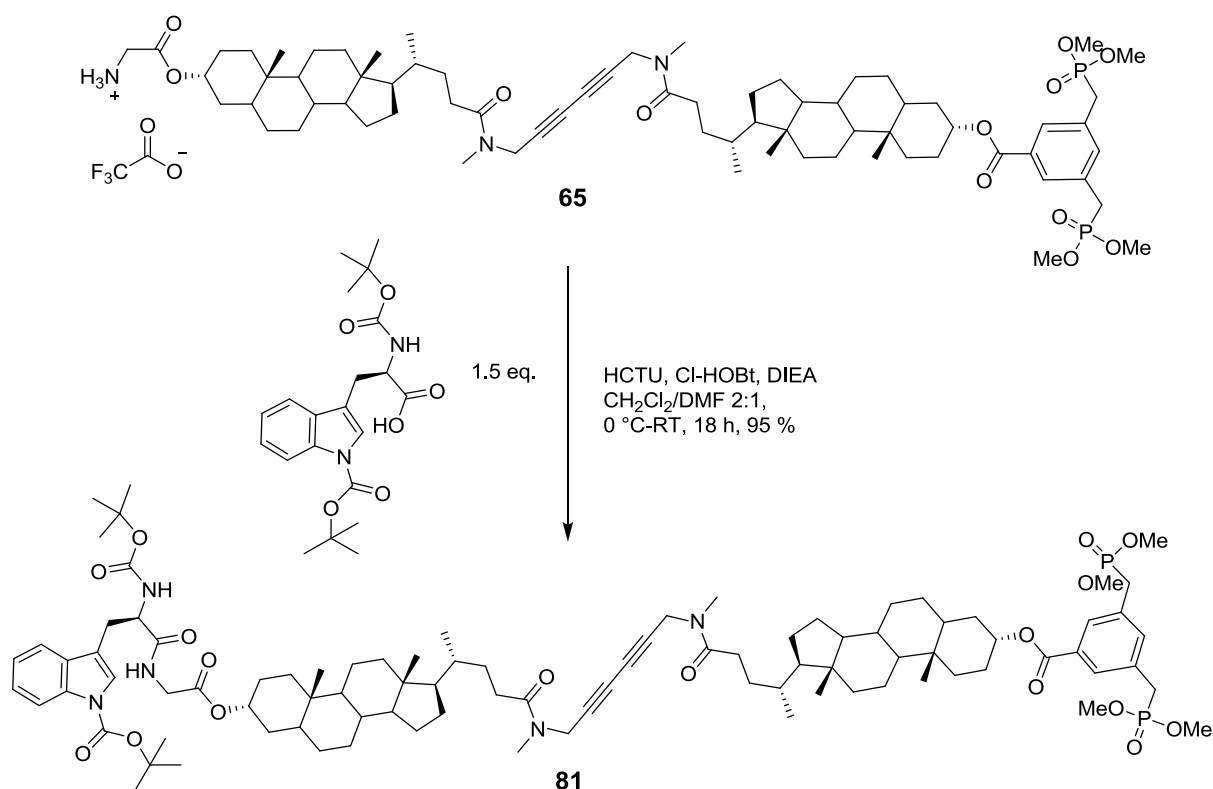


Abbildung 87: Synthese des Tryptophanbausteins **81** mit zweifach Boc-geschützter Kopfgruppe.

Für die selektive Abspaltung der heterozyklischen Boc-Gruppe wurde der Baustein **81** in Dichlormethan gelöst und 2 eq. Trifluoressigsäure bei 0 °C zugegeben. Als Kationenfänger wurde Anisol verwendet, um mögliche Alkylierungsreaktionen zu vermeiden. Literaturbekannt ist, dass sich unter diesen Bedingungen selektiv eine von zwei Boc-Schutzgruppen eines Stickstoffatoms entfernen lässt.^[222] Die *N*-heterozyklische Boc-Gruppe konnte auf diesem Wege vollständig entfernt werden. Allerdings wurde auch ein geringer

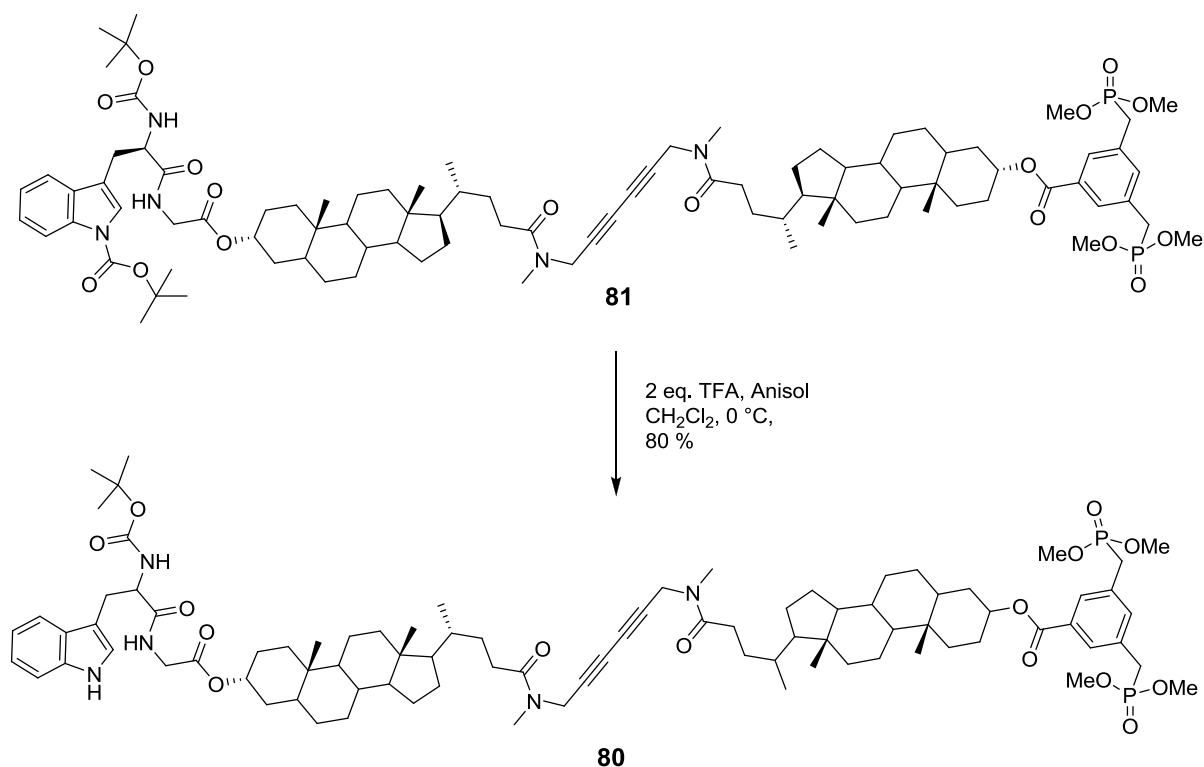


Abbildung 88: Selektive N-heterozyklische Entschützung des Bausteins 81.

Teil der zweiten im Molekül vorhandenen Boc-Schutzgruppe abgespalten. Aufgrund geringer Polaritätsunterschiede konnten die beiden entstandenen Verbindungen nicht vollständig voneinander getrennt werden.

Als letztes sollten in den Verbindungen **80** und **81** zwei der Phosphonsäuremethylester mit Lithiumbromid gespalten werden. Diese Reaktion ist in der Arbeitsgruppe *Schrader* eine etablierte Methode für die letzte Stufe einer Synthese. Der Vorteil dieser Reaktion besteht darin, dass die Spaltung in Acetonitril durchgeführt wird. Während der Reaktion fällt das Produkt als Lithiumsalz aus, wobei die eventuell noch vorhandenen Verunreinigungen in Lösung bleiben. An den Modellverbindungen **76** und **78** konnte im Vorfeld schon gezeigt werden, dass diese Reaktionssequenz keine weiteren Probleme aufwerfen sollte. In beiden Fällen konnte das Produkt als farbloser, feinkristalliner Feststoff mit quantitativem Umsatz erhalten werden. Für den Baustein **80** liegt allerdings aus zuvor angeführten Gründen ein Gemisch aus N-terminal Boc-geschütztem **66** und ungeschütztem **82** vor. Für die nachfolgenden Signaltransduktionsexperimente kann somit nur der Rezeptor **83** verwendet werden.

Zu klären bleibt, ob die zusätzliche Boc-Schutzgruppe des Indolsystems die Absorptions- und Fluoreszenz-Eigenschaften des Rezeptors **83** stark beeinflusst. Abbildung 90 zeigt das ^1H -NMR-Spektrum des Rezeptors **83**.

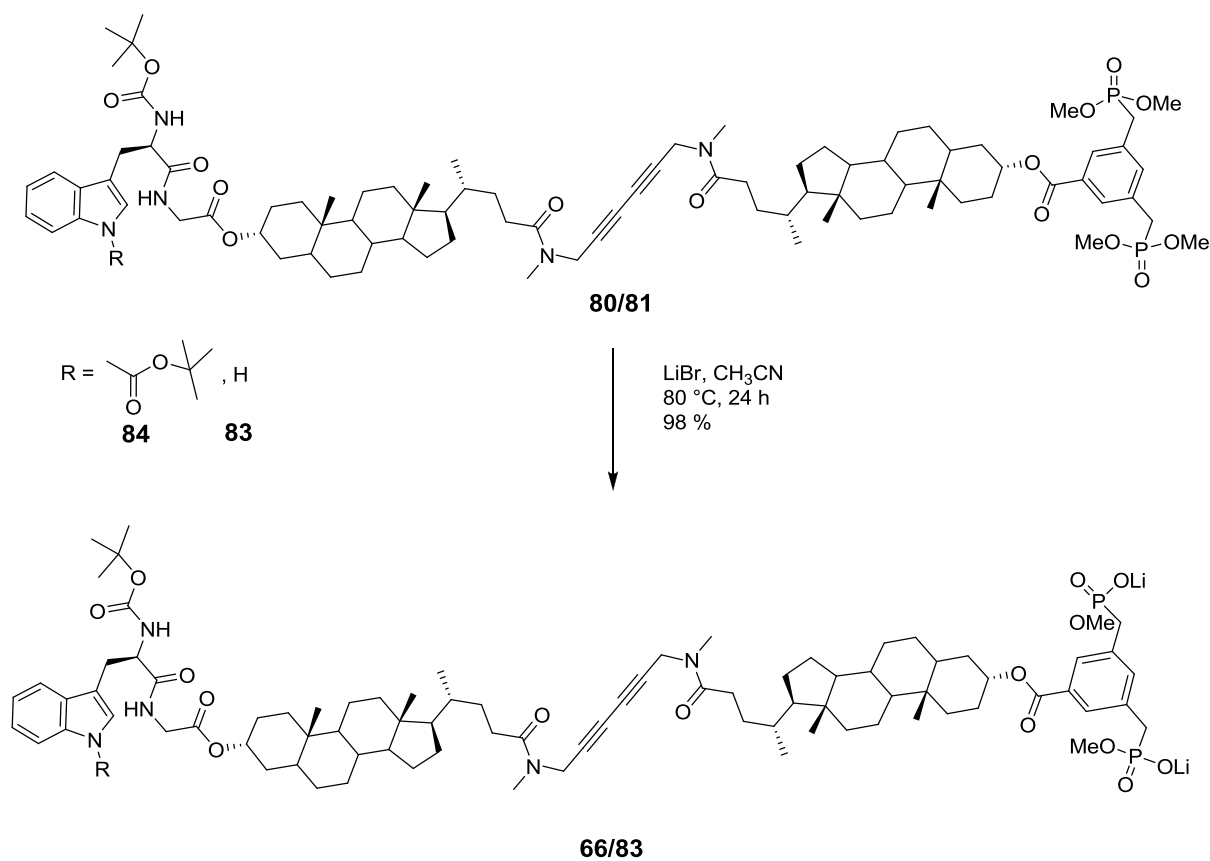
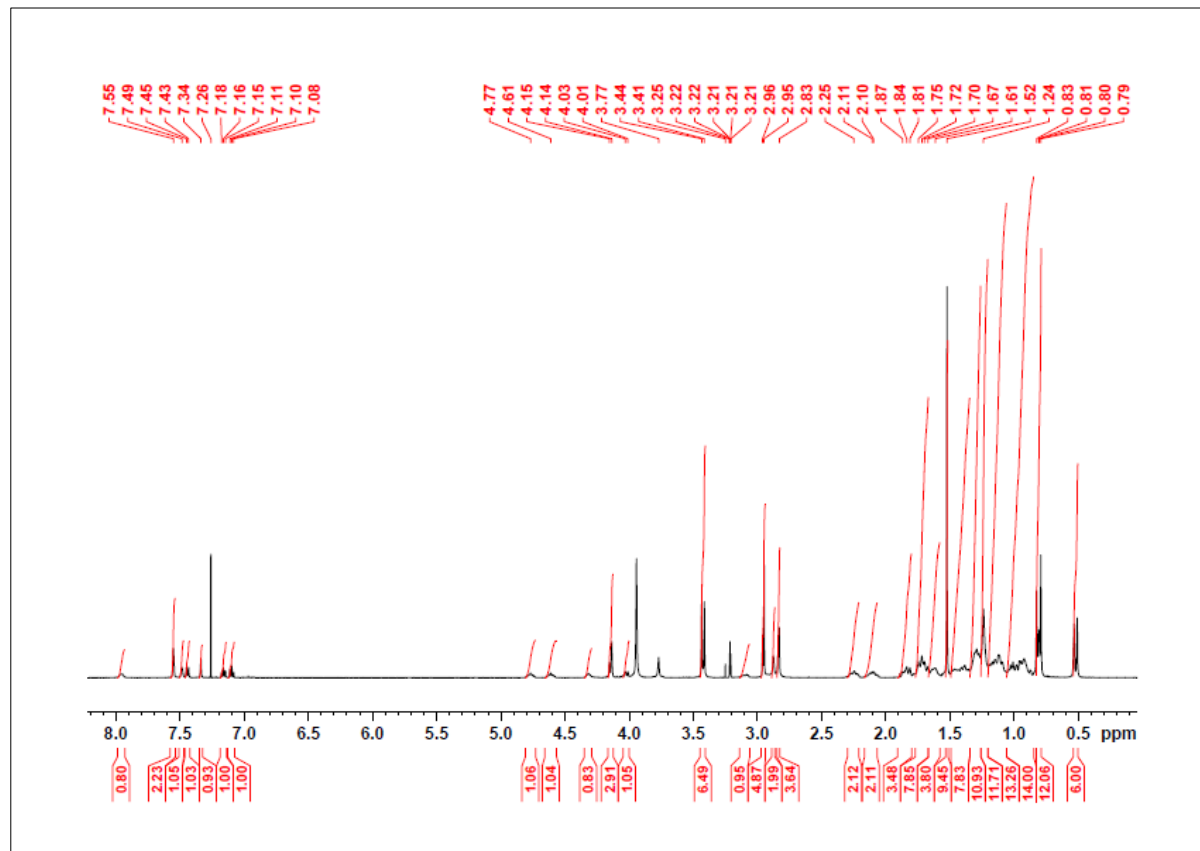


Abbildung 89: Lithiumbromidsplaltung der Transmembranbausteine 80 und 81.

Abbildung 90: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): N-Boc-tryptophan(Boc)-N-glycin-(lithocholsäure-N-methylpropargylamid-Dimer)-BP(OLi)₂ 83.

3.3.3 Synthese des Rezeptors 67 mit Dansyl-Akzeptoreinheit

Die Synthese des Dansyl-Akzeptorbausteins **84** erfolgte durch Umsetzung von Dansyl-Chlorid und der Gerüsteinheit **65**. Unter Verwendung von DIEA als Hilfsbase und einem großen Überschuss des Sulfonsäurechlorids, konnte die Verbindung **84** mit guten Ausbeuten erhalten werden.

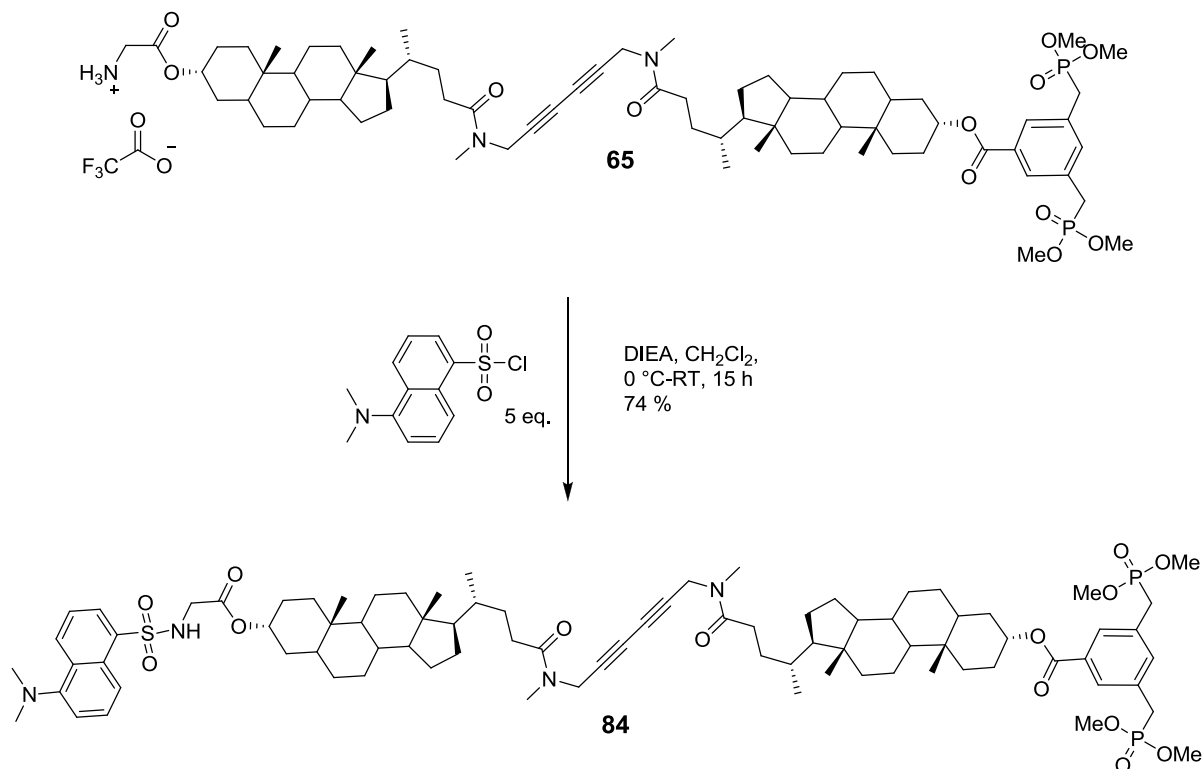


Abbildung 91: Synthese des Dansyl-Akzeptorbausteins **84**.

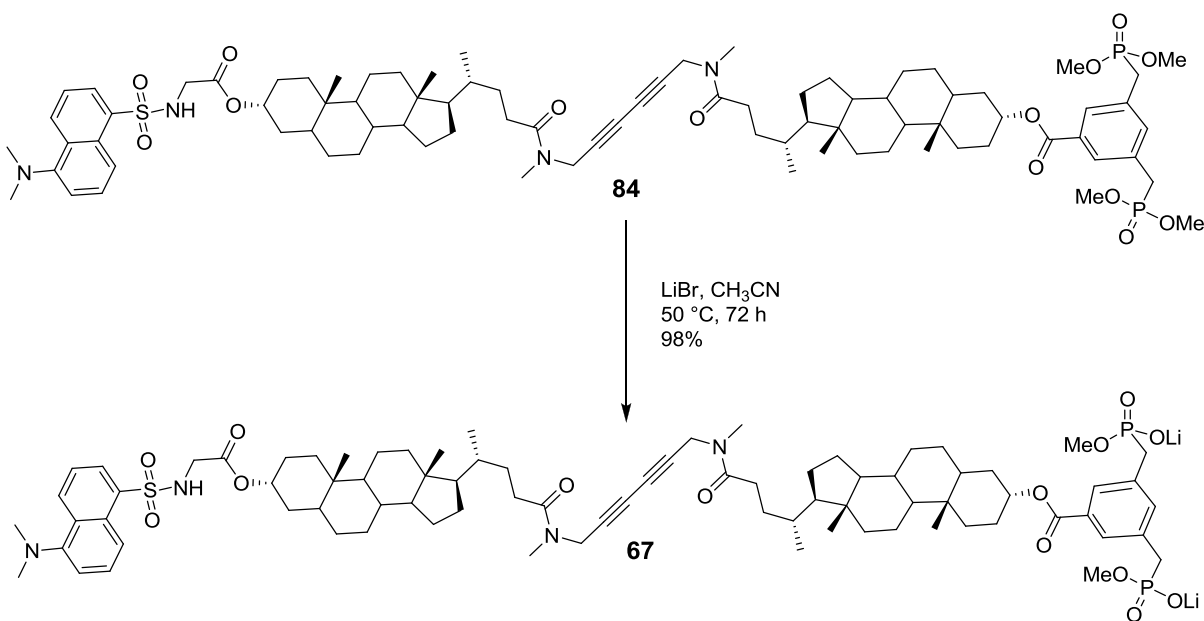


Abbildung 92: LiBr-Spaltung des Dansyl-Akzeptorbausteins **84**.

An der so erhaltenen Verbindung **84** wurden nun ebenfalls zwei der Phosphonsäuremethylester, nach der bereits zuvor beschriebenen Methode, mit LiBr gespalten. Auch hier verlief die Reaktion mit quantitativem Umsatz. Allerdings musste die Reaktionsführung aufgrund der empfindlicheren Dansylfunktion leicht modifiziert werden. Das Erhitzen unter Rückfluss lieferte nur sehr geringe Ausbeuten der Verbindung **67**. ^1H -NMR-spektroskopische Untersuchungen zeigten, dass nur noch ein sehr geringer Anteil der Dansylfunktion im Molekül **67** verliehen ist. Aus diesem Grund wurde die Lithiumbromid-Spaltung bei 50 °C und einer verlängerten Reaktionszeit von 72 h durchgeführt. Abbildung 93 zeigt das ^1H -NMR-Spektrum der Zielverbindung **67**.

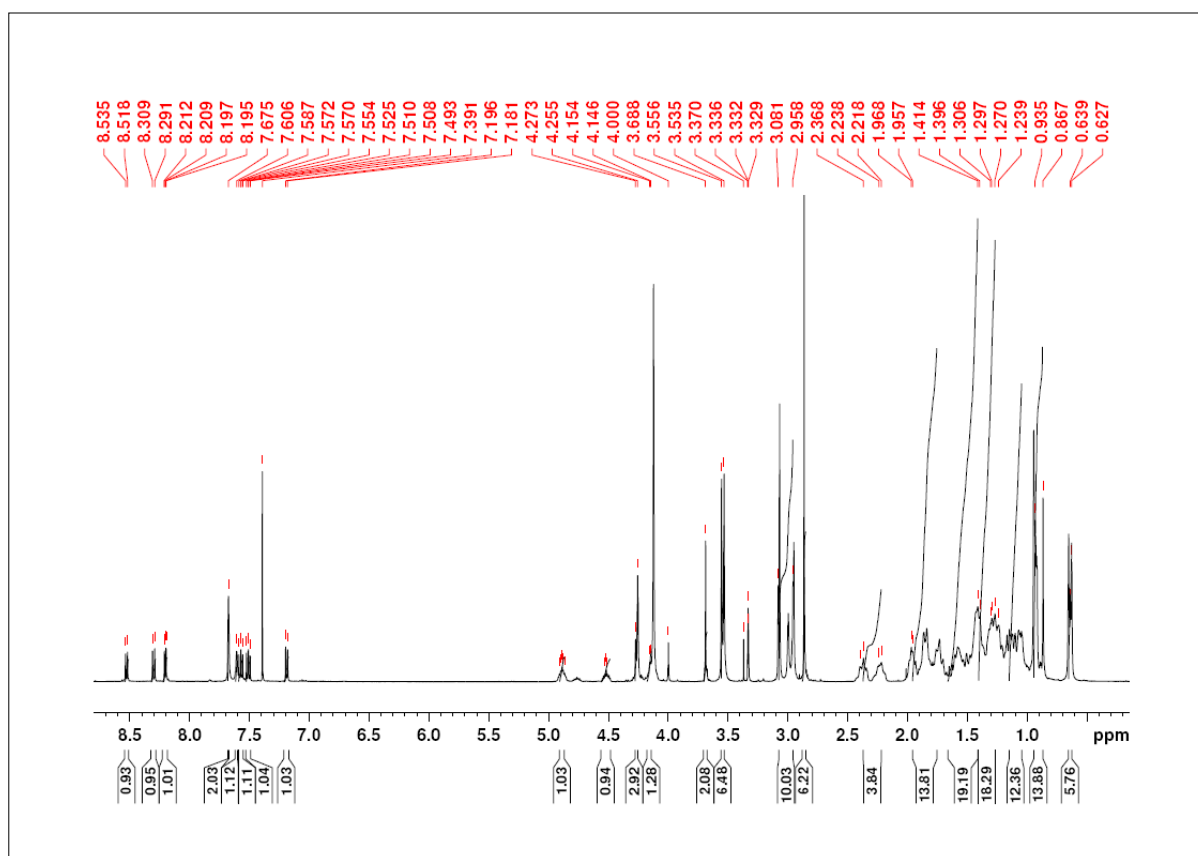


Abbildung 93: ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3): Dansyl-*N*-glycyl-(lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-BP(OLi)₂ **67**.

3.3 Signaltransduktionsexperimente mit den Rezeptoren 83 und 67

3.3.1 Fluoreszenzspektroskopie

Bei einer großen Zahl organischer Verbindungen, insbesondere bei ungesättigten Kohlenwasserstoffen, kann man nach Einstrahlung in deren Absorptionsbande eine Emission von Licht, die Fluoreszenz, beobachten. Fluoreszenzemission und strahlungslose Desaktivierungsprozesse organischer Verbindungen lassen sich mit dem Jablonski-Diagramm beschreiben (Abbildung 94). Bei Raumtemperatur befinden sich die meisten Moleküle im nied-

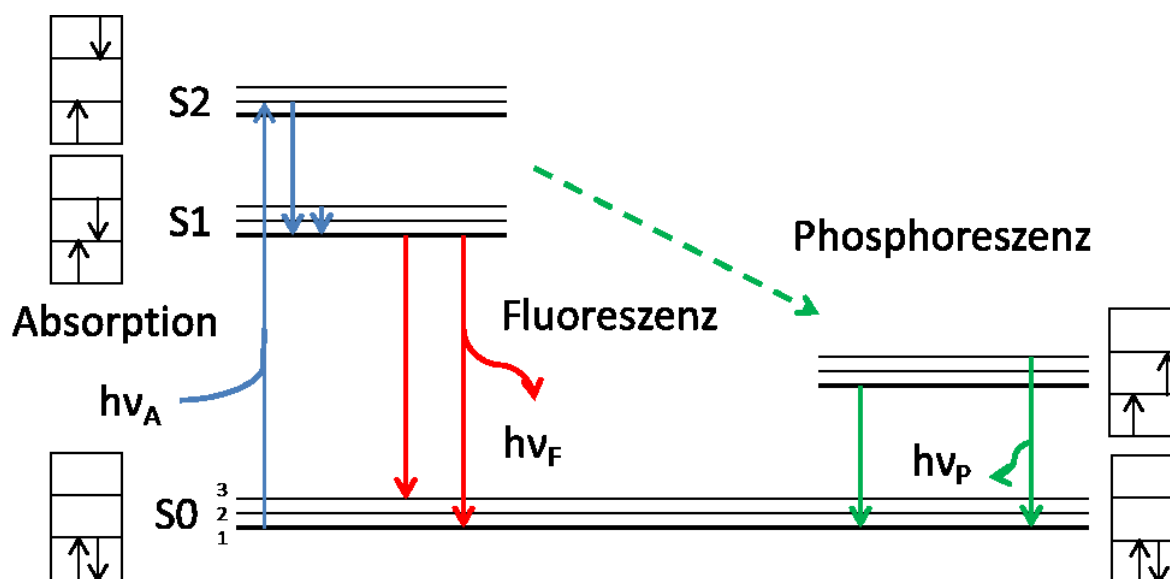


Abbildung 94: Jablonski-Diagramm.

rigstem Schwingungsniveau des elektronischen Grundzustandes S_0 . Durch Absorption eines Photons, mit der eines Übergangs entsprechenden Energie, wird das System innerhalb von 10^{-15} s in einen angeregten Zustand angehoben. In welches Schwingungsniveau das Molekül dabei transportiert wird, kann klassisch und quantenmechanisch mittels des Frank-Condon-Prinzips beschrieben werden. Durch Stöße und andere strahlungslose Deaktivierungsprozesse (IC, *Internal Conversion*) verliert es Energie. Innerhalb von, typischerweise 10^{-12} s, relaxiert das Molekül zum niedrigsten angeregten Elektronenzustand S_1 , der eine Lebensdauer in der Größenordnung von 10^{-9} s hat. Erfolgt aus diesem Zustand, durch Emission eines Photons, die Rückkehr in den elektronischen Grundzustand S_0 , spricht man dabei von Fluoreszenz (Kasha-Regel).^[223,224] Durch Spin-Umkehr kann das angeregte System ebenfalls in einen metastabilen Triplett-Zustand T_1 übergehen (ISC, *Inter System Crossing*), von dem es, durch erneute Spin-Umkehr und Emission eines Photons, nur langsam in den elektronischen Grundzustand S_0 gelangt. Dieser Prozess verläuft deutlich langsamer. Man spricht dabei von Phosphoreszenz. Die Wellenlänge des emittierten Photons ist bei diesen Prozessen gegen-

über dem absorbierten Photon zu größeren Wellenlängen verschoben. Das Fluoreszenzspektrum ist somit ebenfalls gegenüber dem Absorptionsspektrum verschoben (Abbildung 96). Diese, als Stokes-Shift bezeichnete Verschiebung des Emissionsmaximums, resultiert aus den bereits erwähnten strahlungslosen Deaktivierungsprozessen, die aus Kollisionsprozessen mit dem Lösungsmittel (Lösungsmittelrelaxation) oder der in Lösung befindlichen Fluoreszenzquencher, sowie strukturellen Veränderungen während des Übergangs resultieren können. Nach Anregung einer fluoreszierenden Probe mit Licht der Intensität $I_0(\lambda_{Ex})$ und der Wellenlänge λ_{Ex} , wird ein Teil der absorbierten Energie also wieder in Form von Strahlung der Intensität $I_F(\lambda_{Ex}, \lambda_{Em})$ bei der Wellenlänge λ_{Em} emittiert, die Informationen über die Eigenschaften der Probe enthält. Die ermittelbaren Messgrößen sind die Fluoreszenzintensität I_F , das Fluoreszenzspektrum, die Fluoreszenzlebensdauer τ und die Fluoreszenzpolarisation. Die Fluoreszenzintensität I_F wird im Wesentlichen durch die Konzentration c und den Extinktionskoeffizienten ϵ des fluoreszierenden Stoffes, die Fluoreszenzquantenausbeute Φ und die Anregungsenergie bestimmt. Die Emission hängt, wie bereits beschrieben, fast ausschließlich vom ersten angeregten elektronischen Zustand ab ($S_0 - S_1$). Diese Lebensdauer kann unter Berücksichtigung der Deaktivierungsprozesse in Form eines Geschwindigkeitsgesetzes beschrieben werden.^[223,224]

Für die Abnahme gilt:

$$dn' = k \times n' dt \quad (2)$$

$$n' = n'_0 \times e^{-kt} \quad (3)$$

Die Zerfallskonstante k setzt sich dabei aus den Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten der verschiedenen Reaktionskanäle zusammen:

$$k = k_F + k_{IC} + k_{ISC} + k_{PC} \quad (4)$$

Der Term k_{PC} beschreibt den Anteil der durch photo-induzierte chemische Reaktionen abgebaut wird. Die Lebensdauer τ ist, analog der Halbwertszeit beim radioaktiven Zerfall, definiert als die Zeit für die gilt $\tau = 1/k$ und somit n' auf $n'e^{-1}$ abgefallen ist. Das Verhältnis von eingestrahlt Lichtquanten N_{Abs} zu emittierten Fluoreszenzquanten N_F wird als Quantenausbeute Φ bezeichnet. Sie ist maximal 1, wenn sämtliche absorbierten Photonen wieder als Fluoreszenz abgegeben werden.

$$\Phi_F = \frac{N_F}{N_{Abs}} \quad (5)$$

Mit (3) und (4) ergibt sich unter Berücksichtigung von N_F gegen n' :

$$\Phi = \frac{k_F n'}{k_F n' + k_{IC} n' + k_{ISC} n' + k_{PC} n'} = \frac{k_F}{K} = k_F \tau \quad (6)$$

$$\Phi = \frac{k_F}{k_F + k_{IC} + k_{ISC} + k_{PC}} = \frac{k_F}{K} = k_F \tau \quad (7)$$

Abbildung 95 zeigt den typischen Aufbau eines Fluoreszenzspektrometers.

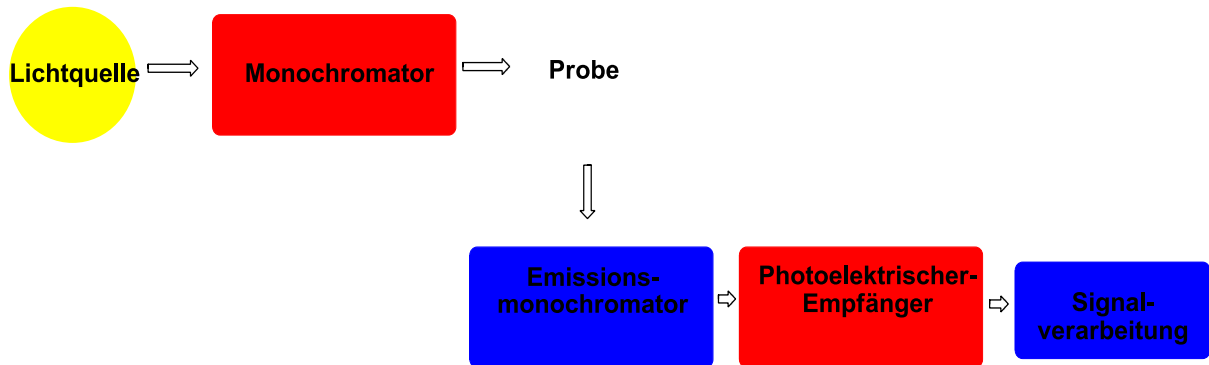


Abbildung 95: Schematischer Aufbau eines Fluoreszenzspektrometers.

3.2.2 Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)

Die FRET-Methode (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer)^[225-227] erlaubt es Distanzen oder Veränderungen in Biomolekülen zu bestimmen. Hierzu müssen ein Biomolekül mit zwei Sonden oder zwei miteinander in Wechselwirkung stehende Biomoleküle, mit jeweils

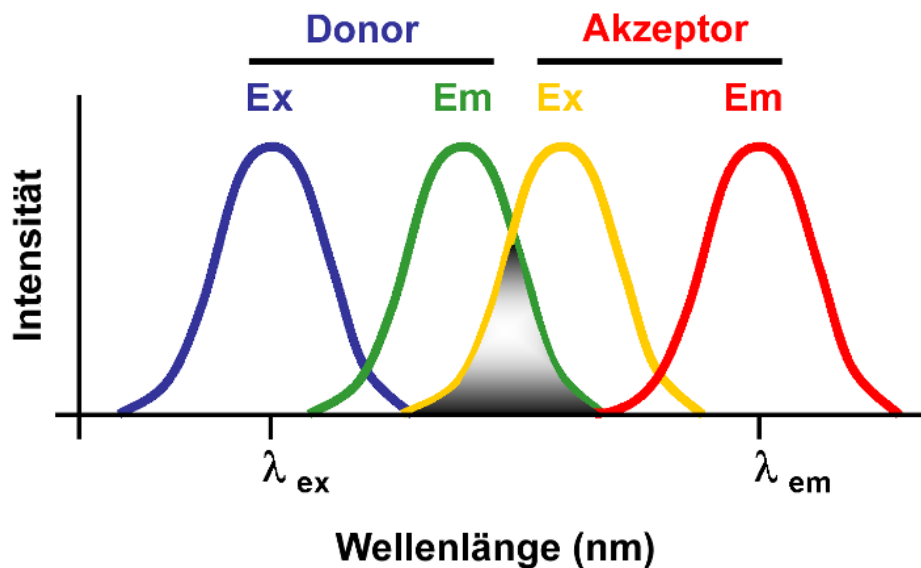


Abbildung 96: Spektrale Überlappung des Donor-Fluoreszenz- und des Akzeptor-Absorptionsspektrums.^[228]

einer Sonde ausgestattet werden. Ein Fluorophor wird als Donor, der andere als Akzeptor bezeichnet. Grundvoraussetzung für die Energieübertragung ist die spektrale Überlappung des Donor-Fluoreszenz- und des Akzeptor-Absorptionsspektrums (Abbildung 96). Der Energietransfer ist umso effizienter, je größer das Überlappungsintegral (Abbildung 96 grau)

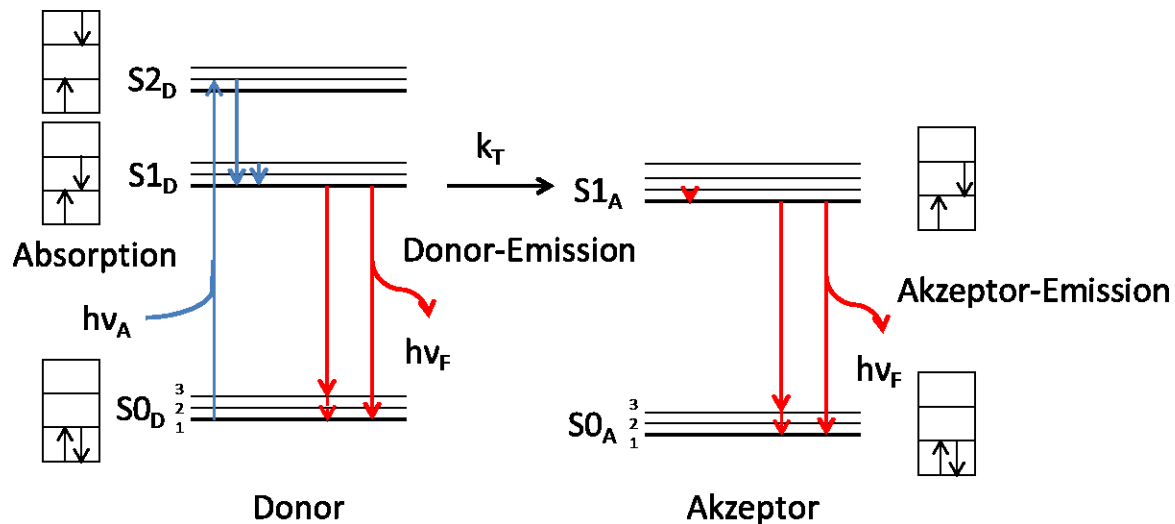


Abbildung 97: Jablonski-Diagramm involvierter Energielevel von Donor und Akzeptor während des Fluoreszenz-Energietransfers.

ist. Die Absorption des Donors erfolgt bei kleineren Wellenlängen als die des Akzeptors. FRET bedeutet nun, dass die Singulett-Singulett Übergänge der Fluorophore miteinander in Resonanz stehen. Gekoppelt sind die Absorptions-Übergangsdipolmomente des Donors und die Emissions-Übergangsdipolmomente des Akzeptors. Der Donor wird durch Absorption eines Photons in einen angeregten Zustand versetzt. Nach Relaxation in den ersten elektronisch angeregten Zustand $S1_D$ erfolgt jetzt nicht ausschließlich, wie bei alleiniger Anwesenheit des Donors, die Rückkehr in den elektronischen Grundzustand $S0_D$ durch Fluoreszenzemission, sondern ein Energietransfer auf den Akzeptor. Dieser wird hierdurch in einen angeregten Zustand versetzt und relaxiert seinerseits in den ersten elektronisch angeregten Zustand $S1_A$. Ist der Akzeptor selber fluoreszierend, so emittiert dieser bei seiner charakteristischen Emissionswellenlänge (Abbildung 97). Fluoresziert dieser selber nicht, wird die Energie über andere akzeptortypische Kanäle, wie z.B. Singulett-Triplett-Übergänge oder einfach *internal conversion* (IC) abgegeben. In beiden Fällen ist die Fluoreszenz des Donors bei gleich starker Anregung deutlich schwächer. Die Effizienz der Energieübertragung ist stark vom Abstand der beiden Fluorophore zueinander abhängig. Der Abstand bei den 50 % der Energie des Donors auf den Akzeptor übertragen werden, wird als Förster-Radius bezeichnet. Der Förster-Radius lässt sich aus intrinsischen Parametern der Fluorophore ermitteln.

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-23} \Phi k^2 h^{-4} J(1) \quad (8)$$

Φ ist die Quantenausbeute, k der Orientierungsfaktor der Fluorophore, h der Brechungsindex des Lösungsmittels und $J(1)$ das Überlappungsintegral. Die Effizienz des Energietransfers

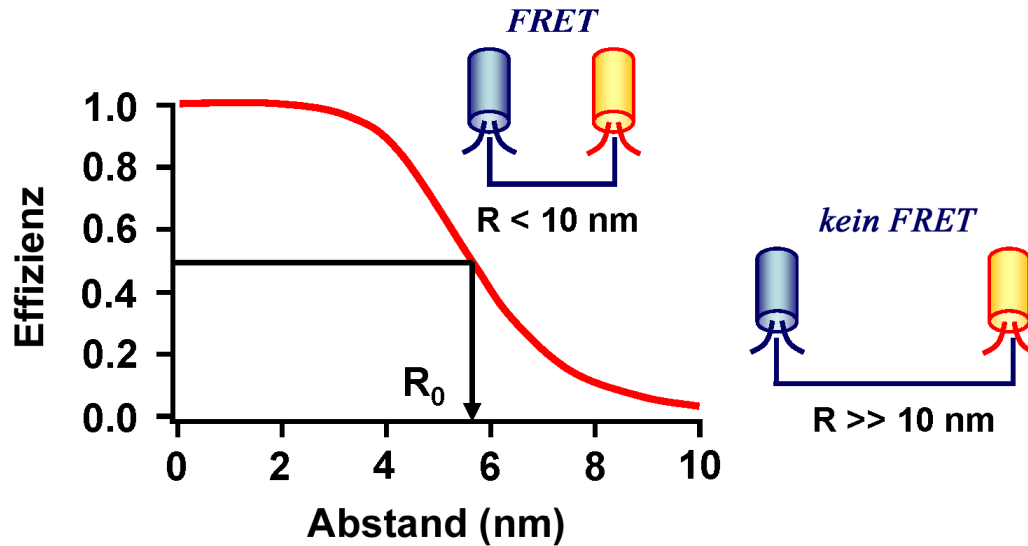


Abbildung 98: Effizienz des Energietransfers zwischen einem Donor-Akzeptor-Paar.^[229]

E_{FRET} wird durch folgende Formel beschrieben:^[227]

$$E_{FRET} = \frac{1}{1 + \left(\frac{R}{R_0}\right)^6} \quad (9)$$

Gleichung (9) und Abbildung 98 veranschaulichen die starke Abhängigkeit der Übertragungseffizienz E_{FRET} vom Abstand der beiden Fluorophore zueinander. Diese nimmt mit der sechsten Potenz des Abstandes ab. Ein weiteres Kriterium für den resonanten Energie-

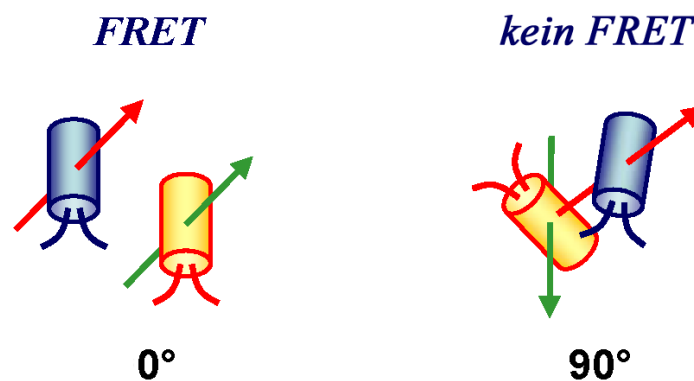


Abbildung 99: Notwendige Orientierung zwischen Donor und Akzeptor zur effizienten Energieübertragung.^[230]

Transfer ist die Orientierung der Übergangsdipolmomente der beiden Fluoreszenzfarbstoffe zueinander. Der bereits in Gleichung (8) angeführte Orientierungsparameter k kann Werte zwischen 1 und 4 annehmen. In freier Lösung beträgt dieser $2/3$. Sind die Übergangsdipolmomente orthogonal zueinander orientiert, ist ein Fluoreszenz-Energie-Transfer nicht möglich, da das Überlappungsintegral $J(1)$ für diese Orientierung annähernd null ist (Abbildung 99).^[223,224]

Der Fluoreszenz-Energie-Transfer ist eine in der Biochemie und Molekularbiologie häufig genutzte Methode. So werden die Fluoreszenzsonden Fluorescein und Rhodamin verwendet, um Protein-Protein-Interaktionen zu analysieren. Die Proteine werden mit den Farbstoffen markiert, so dass bei einer Interaktion der zu untersuchenden Proteine eine Zunahme des Energietransfers beobachtet werden kann. Des Weiteren können Konformationsänderungen innerhalb von Proteinen direkt beobachtet werden, in dem definierte Stellen im Protein mit Fluoreszenzsonden markiert werden.

Häufig macht man sich hierbei die natürliche schwach fluoreszierende Aminosäure Tryptophan (**61**) zu Nutze. Eines, der am meisten genutzten Donor-Akzeptor-Paare ist das Paar Tryptophan (**61**) und Dansyl (**62**). Der Förster-Radius beträgt 21 \AA . Geht man davon aus, dass genaue Messungen der Fluoreszenz im Messbereich 10 % Fluoreszenz – 90 % Fluoreszenz durchgeführt werden können, so ergeben sich in diesem Fall Distanzen von ca. 11 \AA bis 37 \AA . Der Vorteil dieses Paares liegt in den weit voneinander entfernten Emissionsmaxima. Tryptophan absorbiert bei ca. 280 nm und emittiert in Abhängigkeit der chemischen Umgebung zwischen 300 nm und 350 nm . Das Absorptionsmaximum des Dansyl-Fluorophors liegt bei ca. 320 nm und das Emissionsmaximum zwischen 500 nm und 560 nm .

Die schematische Darstellung der Energieübertragung, für die in dieser Arbeit verwendeten Tryptophan- und Dansylderivate **83** und **67**, ist in Abbildung 100 dargestellt.

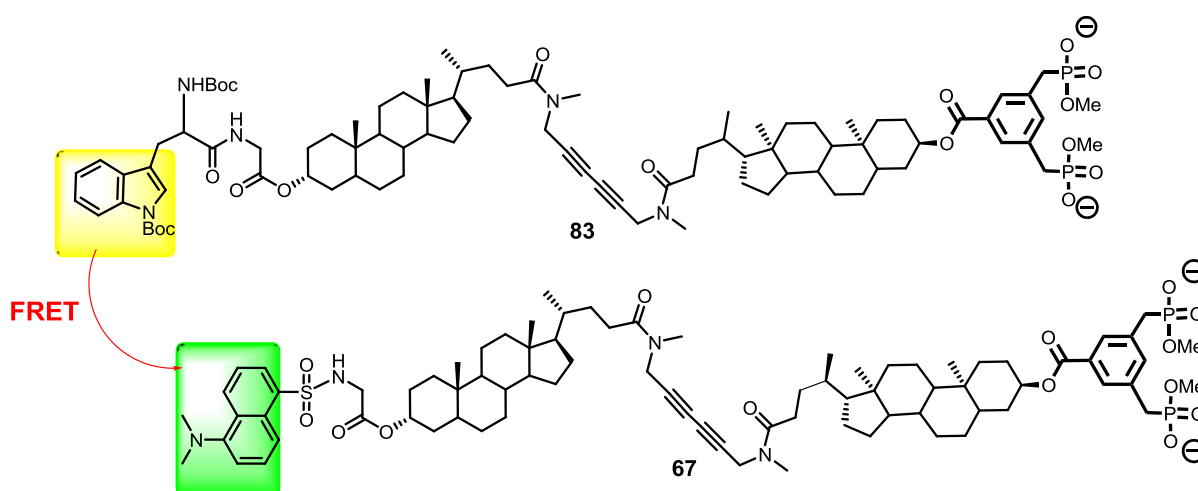


Abbildung 100: Schematische Darstellung des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers von **83** auf **67**.

3.3.3 Einlagerung der Rezeptoren 83 und 67 in DPPC-Liposomen

3.3.3.1 Vorbereitende Messungen

Die Präparation der Liposomen sollte mit den Bausteinen **83** und **67** erfolgen. Der Rezeptor **66** sollte für die ersten Messungen nicht verwendet werden, da aus bereits angeführten Gründen ein geringer Anteil an freien Aminofunktionen vorhanden ist. Die mögliche Bildung unproduktiver Dimere könnte zu weniger aussagekräftigen Ergebnissen führen. Baustein **83** besitzt eine Tryptophaneinheit, an der sowohl die primäre Aminofunktion, als auch das *N*-heterozyklische Stickstoffatom mit einer Boc-Gruppe geschützt sind.

Um die Eignung des zweifach geschützten Tryptophans als FRET-Donor zu überprüfen, wurden in Vorversuchen UV-Vis- und Fluoreszenzspektren von **83** aufgenommen, um die Absorptions- bzw. Emissionsmaxima zu bestimmen. Hierzu wurden $5 \cdot 10^{-5}$ molare Lösung in Methanol : Wasser = 9 : 1 hergestellt. Dies entspricht einer späteren Liposomendotierung von 5 %. Das in Abbildung 101 dargestellte Absorptionsspektrum von **67** (violett)

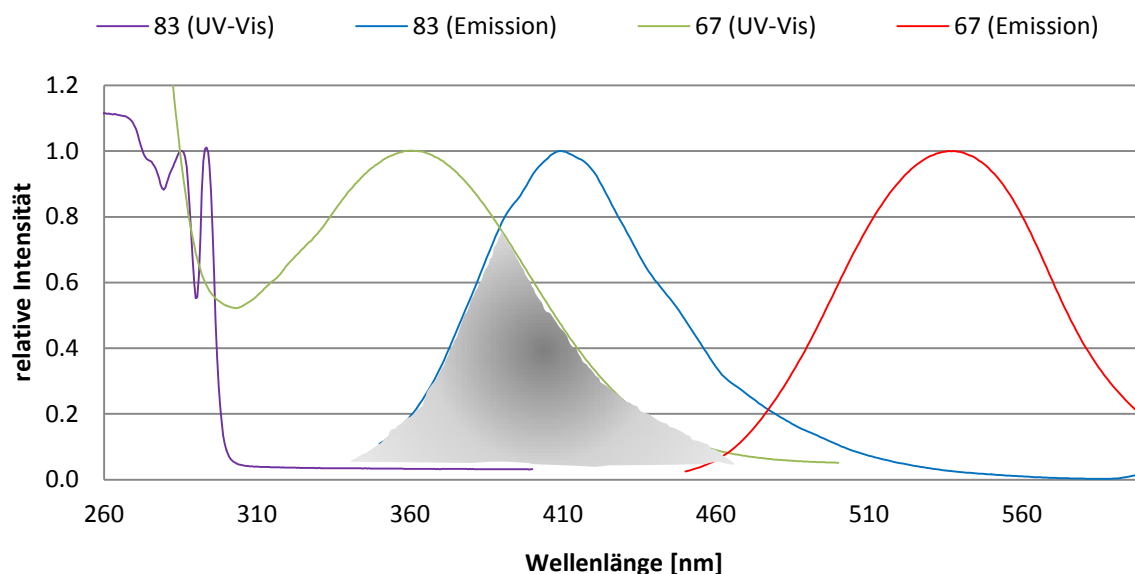


Abbildung 101: UV-Vis- und Fluoreszenzspektren der Transmembranbausteine 83 und 67 in MeOH.

zeigt zwei Absorptionsmaxima bei 285.5 nm und 293.5 nm. Aus dem Vergleich mit den Literaturdaten^[174] geht hervor, dass **83** ein um 5-15 nm längerwelliges Absorptionsmaximum besitzt, als heterozyklisch ungeschütztes Tryptophan (280 nm). Das Emissionsspektrum von **83** (Abbildung 101, blau) weist im Gegensatz zum heterozyklisch ungeschützten Tryptophan eine deutliche bathochrome Verschiebung von 80 nm auf.^[174] Neben dem räumlichen Abstand ist, wie bereits angeführt, das Überlappungsintegral $J(1)$ von Donor-Emissions- und Akzeptor-Absorptionsspektrum eine notwendige Bedingung für einen erfolgreichen Ener-

gietransfer vom Fluoreszenz-Donor auf den -Akzeptor. Die Absorptions- und Emissionsspektren des Bausteins **67** sind ebenfalls in Abbildung 101 dargestellt. Es ist ersichtlich, dass das Emissionsspektrum des FRET-Donors **83** (blau) und das Absorptionsspektrum des FRET-Akzeptors **67** (grün) über einen breiten Wellenlängenbereich überlappen. Somit ist die Grundvoraussetzung für das Gelingen eines Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers erfüllt. Ein Sachverhalt bleibt allerdings noch zu klären. Im idealisierten Fall sollte bei genügend großem Abstand zwischen den beiden Rezeptoren **83** und **67**, aufgrund eines ausbleibenden FRET-Effekts oder bei alleiniger Anwesenheit des Akzeptors **67**, keine Emission des Akzeptors **67** bei der Anregungswellenlänge des Donors **83** detektiert werden können. Allerdings ist im realen Experiment immer mit einer geringen Anregung des Akzeptors **67** bei kleineren Wellenlängen zu rechnen. Aus diesem Grund wurde ein weiteres Emissionsspektrum des Rezeptors **67** bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm aufgenommen. Dies entspricht der Anregungswellenlänge im Experiment. Das Fluoreszenzspektrum von **67** zeigt

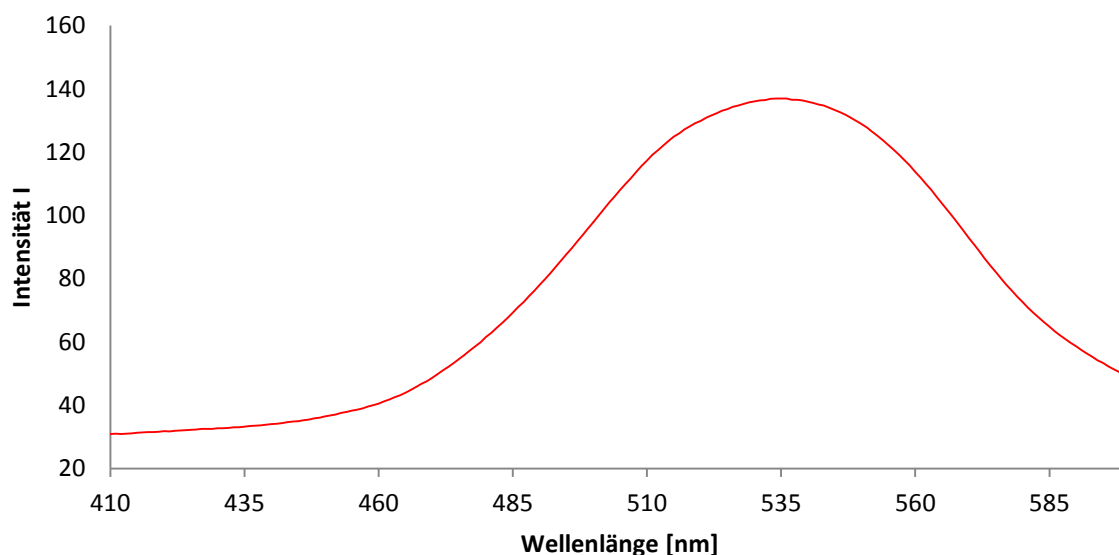


Abbildung 102: Emissionsspektrum von **67** bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm.

auch bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm das bekannte Emissionsmaximum von 540 nm. Interessanterweise emittiert **67** bei dieser geringeren Anregungswellenlänge mit einer beträchtlichen Intensität. Diese entspricht etwa 70 % der Intensität, die bei der Anregung am eigentlichen Absorptionsmaximum ($\lambda_{\text{Em}} = 330 \text{ nm}$) erreicht wird. Dieser Sachverhalt ist bei der späteren Auswertung des eigentlichen Experiments zu berücksichtigen. Mit den vorliegen Kontrollmessungen sollten im Folgenden die tryptophan-bzw. dansylmarkierten transmembranen Rezeptoren **83** und **67** in Liposomen eingelagert und vermessen werden.

3.3.3.2 Liposomenpräparation

Die Herstellung der Liposomen erfolgte im Wesentlichen nach einer von *Hunter* veröffentlichten Vorschrift.^[143] Als Matrixmaterial für die Liposomen dienen DPPC (Dipalmitoyl-phosphatidylcholin) und DMPC (Dipalmyristoylphosphatidylcholin). Zur Herstellung der Liposomen wurden das Liposomenmatrixmaterial und die Transmembranbausteine **83** und **67** in einem Verhältnis von 40:1:1 gemischt und anschließend in Chloroform gelöst. Das jeweilige Gemisch wurde am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingedunstet und die so erhaltenen dünnen Filme, bestehend aus den drei Komponenten zwei Stunden lang gefriergetrocknet. Die Rückstände wurden in wässrigem MES-Puffer (375 mmol/L, pH = 5.5) aufgenommen, über die Phasenübergangstemperatur von 23 °C bzw. 40 °C erwärmt und zur Herstellung multilamellarer Liposomen (MLV) mindestens eine Minute gevortext. Um große unilamellare Liposomen (LUV, 200 nm) herzustellen wurde das LiposoFast Basic System von *Avestin* verwendet (Abbildung 103 links).

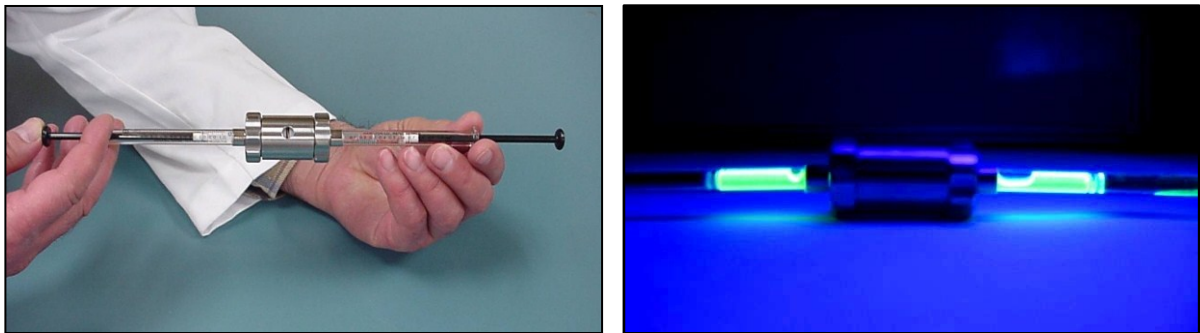


Abbildung 103: links: LiposoFast-Basic-Extruder zur Herstellung unilamellarer Liposomen; rechts: Dotierte Liposomen (2.5 % **83** und 2.5 % **67**).

Hierbei wird die wässrige Lösung multilamellarer Liposomen mehrfach durch eine 200 nm Polycarbonat-Membran extrudiert. Ein Vorteil dieser Präparationsmethode ist die zudem erfolgende Selbstreinigung der Liposomen durch eine ungerade Anzahl von Extrusionszyklen. Eventuell vorhandene Verunreinigungen können die Polycarbonatmembran nicht passieren. Die gereinigte unilamellare Liposomenlösung befindet sich somit auf der anderen Seite der Membran. Abbildung 103 rechts zeigt die Extrusion der Liposomenlösung mit den Bausteinen **83** und **67**.

3.3.3.3 Fluoreszenzmessungen und Signaltransduktion

Für die im Folgenden durchgeführten Signaltransduktionsexperimente wurde Dihylen-triamin-Trihydrochlorid (DET) als primärer Botenstoff verwendet. Dieser kann aufgrund der starken Wasserstoffbrückenbindungen und Coulombwechselwirkungen zwei Bisphosphonatpinzetten chelatartig komplexieren. Aufgrund der geringen Größe des DET ($< 1\text{ nm}$) sollte es bei der Komplexbildung durch die Bisphosphonatpinzetten zu einem engen Kontakt der beiden Transmembranbausteine **83** und **67** kommen. Der Abstand zwischen den beiden intrazellulären Fluorophoren sollte sich in jeden Fall unter den Försterradius $R_0 = 2.1\text{--}2.4\text{ nm}$ verringern, bei dessen Unterschreitung es zu einem Energie-Transfer von 50 % kommt.^[223,224]

Vor der Durchführung der eigentlichen Messungen sollen einige Randbedingungen betrachtet und Überlegungen angestellt werden, um das, im Idealfall maximal zu erwartende Ergebnis der botenstoffinduzierten Signaltransduktion abschätzen zu können. Aufgrund des Einlagerungsverhältnisses lassen sich drei Grenzfälle formulieren:

Das Verhältnis zwischen Liposomenmatrixmaterial und Rezeptor ist

- a. zu klein. In diesem Fall sind die beiden Rezeptoren, die in der Lage sind, einen FRET-Effekt zu induzieren, zu weit voneinander entfernt. Bei Zugabe des primären Botenstoffs erfolgt keine Bildung eines ternären Komplexes. Es kann kein FRET-Effekt detektiert werden.
- b. annähernd so gewählt, dass die Rezeptoren einen mittleren Abstand zueinander aufweisen. Bei Zugabe des DET kommt es zur Ausbildung eines ternären Komplexes. Donor- und Akzeptorbaustein nähern sich einander an und es kann ein FRET-Effekt detektiert werden.
- c. zu groß. Zum einen könnte dies zur Folge haben, dass die präparierten Liposomen nicht stabil sind und die Bausteine **83** und **67** aus der wässrigen Lösung ausgefällt werden. In diesem Fall würde es bei Zugabe des Botenstoffs zu unspezifischen Effekten kommen. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass die Bausteine sich bereits ohne Zugabe des Botenstoffs in einem so geringen Abstand zueinander befinden, dass ein „permanenter“ FRET-Effekt auch ohne Zugabe des Botenstoffs detektiert werden kann.

Außerdem soll der zu erwartende Emissionsanstieg bzw. -abfall diskutiert werden. Hierbei muss die Einlagerung der Bausteine in die Liposomen berücksichtigt werden. Da die Einlagerung statistisch erfolgt, sind 50 % der Rezeptorbausteine für die Signaltransduktion un-

brauchbar (Abbildung 104). Somit reduziert sich die maximal zu erwartende Änderung der Emissionsintensität auf 50 %. Des Weiteren besteht die Möglichkeit der Ausbildung von drei

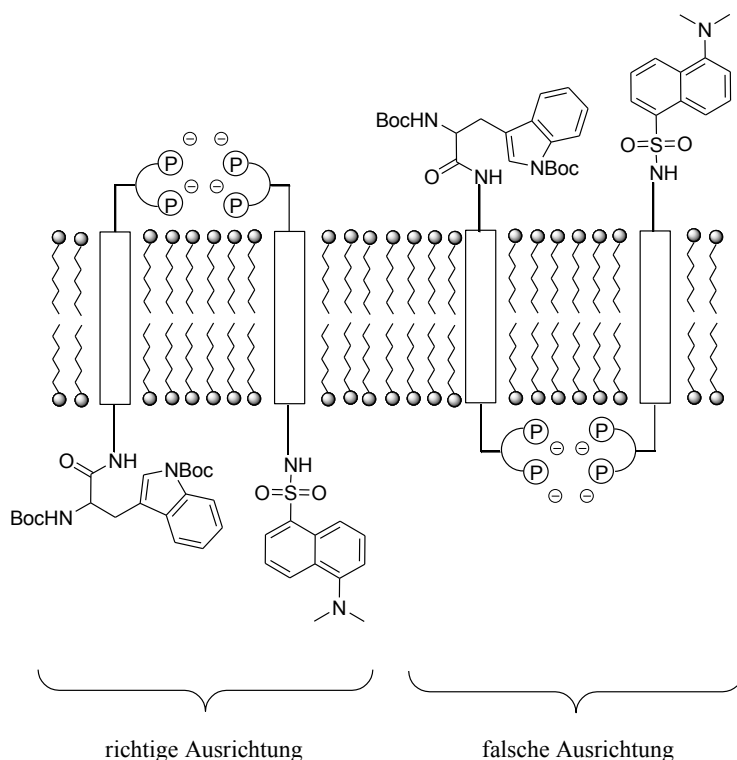


Abbildung 104: Statistische Einlagerung der Rezeptorbausteine 83 und 67 in die Liposomen.

ternären Komplexen. Von diesen ist allerdings nur einer zur Signaltransduktion befähigt (Abbildung 105). Hierdurch verringert sich die zu erwartende Intensitätsänderung noch-

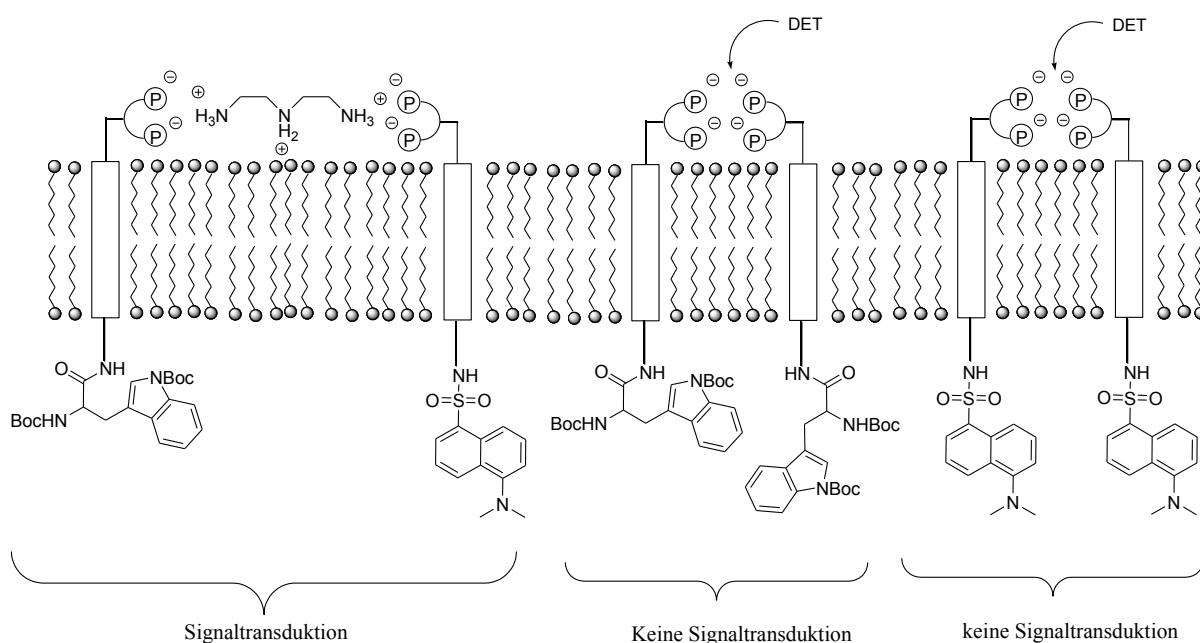


Abbildung 105: Schematische Darstellung der drei möglichen ternären Komplexe bei Zugabe von DET.

mals auf ein Drittel. Das heißt, dass nur 15 % der Bausteine (83) und (67) zu einem Energie-Transfer befähigt sind.

Letzte Überlegungen lassen sich noch bezüglich der Komplexstabilität und der Dynamik der gebildeten ternären Komplexe anstellen. Falls es sich bei dem zur Signaltransduktion befähigten Rezeptor-Komplex **83-DET-67** um einen kinetisch und thermodynamisch stabilen Komplex handelt, sollte nach Zugabe von DET ein dauerhafter FRET-Effekt messbar sein, da ein Gastmolekül, das den Komplex verlässt sofort durch ein neues ersetzt wird. Die Zeitskala wäre für die Transmembranbausteine **83** und **67** zu klein um auseinander zu diffundieren. Für den Fall, dass es sich um einen thermodynamisch und kinetisch labilen Komplex handelt, würde es zu einem schnellen Austausch aller Komplexpartner untereinander kommen. Damit wäre eine permanente Änderung des Abstandes zwischen den Transmembranbausteinen **83** und **67** verbunden, die die Detektion des FRET-Effekts verhindern würde. Da alle Möglichkeiten in Betracht kommen, ist es sinnvoll, das System über einen längeren Zeitraum zu beobachten, sowohl während der Equilibrierungsphase, als auch nach der Zugabe des primären Botenstoffs. Aus diesem Grund wurde nicht nur die zeitliche Änderung der Intensität an beiden Emissionsmaxima, sondern auch die Änderung der Intensität über den gesamten Wellenlängenbereich beobachtet. Die im Folgenden durchgeführten Messungen beziehen sich auf die Bausteine **83** und **67** (Abbildung 104).

Erste Testmessungen wurden mit 2 %- und 5 %-dotierten Liposomen durchgeführt. Die Präparation der Liposomen erfolgte nach der in Kapitel 3.3.3.2 beschriebenen Methode. Zu den mit **83** und **67** dotierten Liposomen wurden nach einer Equilibrierungszeit von etwa 20 min 100 eq. DET zugegeben. Aus Abbildung 106 ist ersichtlich, dass nach Zugabe von

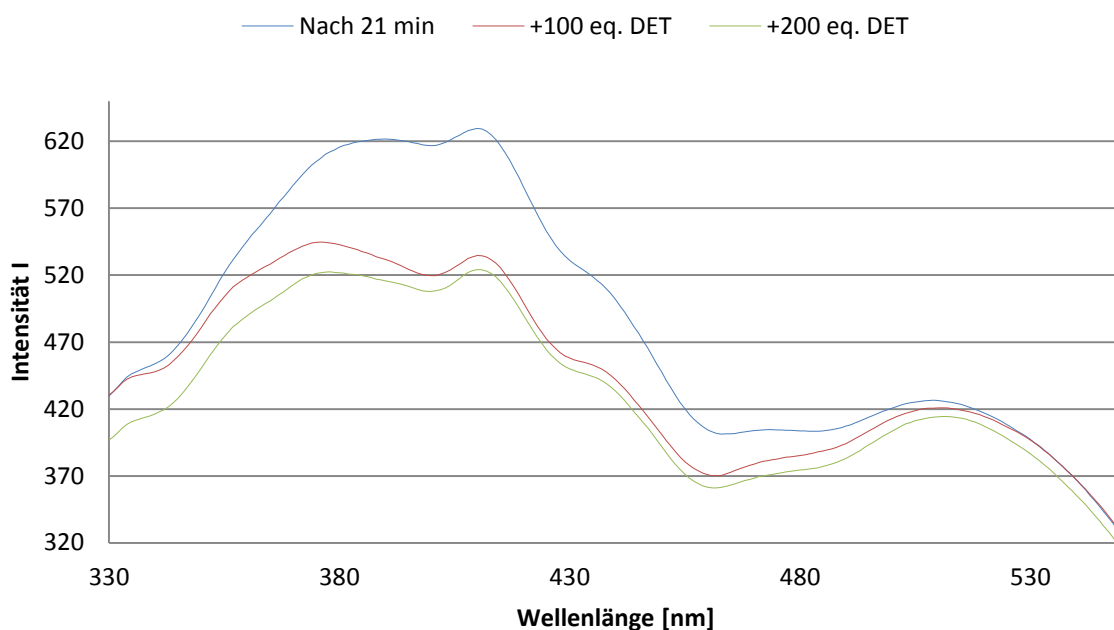


Abbildung 106: Signaltransduktionsexperimente mit den Transmembranbausteinen **83** und **67** (je 1.0 %) in DPPC-Liposomen.

100 eq. DET zu den 2 %-dotierten Liposomen die Emission über den gesamten Wellenlängenbereich abnimmt. Die größte Abnahme ist im Bereich der Tryptophanemission zu finden. Die Zugabe weiterer 100 eq. DET zeigt den gleichen Effekt, allerdings ist hierbei eine geringere Abnahme der Intensität zu verzeichnen. Um einen besseren Einblick in das System zu bekommen, wurden zusätzlich die zeitlichen Änderungen der Emissionsmaxima des Donors **83** und des Akzeptors **67** bestimmt (Abbildung 107 und 108). Es zeigte sich, dass die

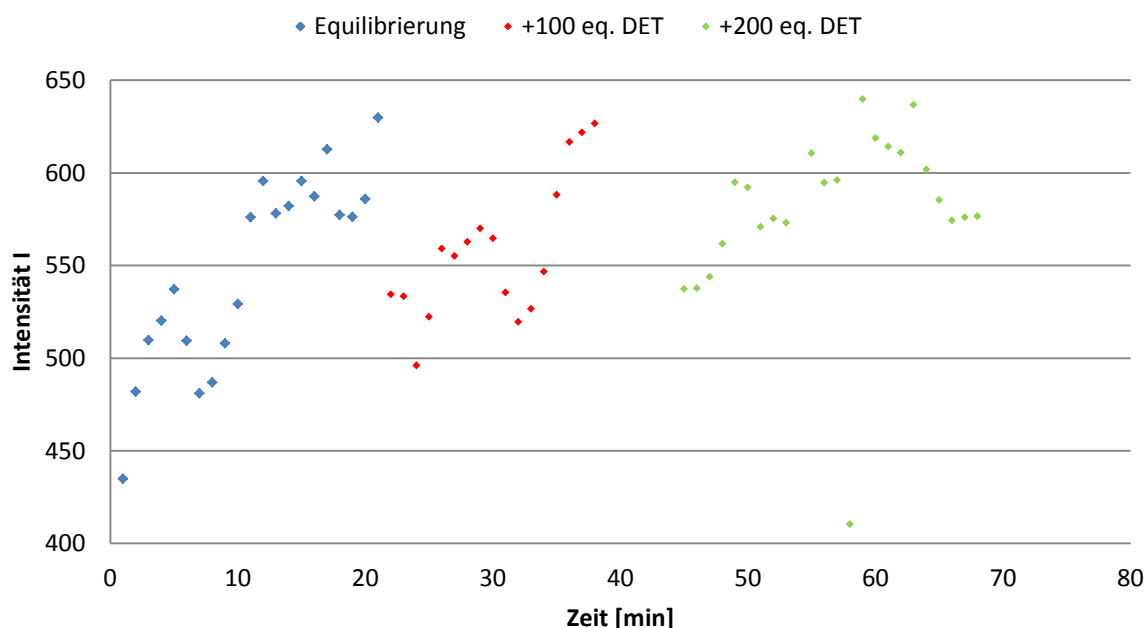


Abbildung 107: Intensitätsänderung der Tryptophanemission ($\lambda = 409$ nm) des Bausteins **83** vor und nach Zugabe des Botenstoffs (100 eq. DET und 200 eq. DET; 2 % Gesamtdotierung).

Emission des Tryptophanbausteins **83** über einen Zeitraum von 20 Minuten kontinuierlich ansteigt. Die Zugabe von 100 eq. DET führte zu einem kurzzeitigen starken Absinken der Emission. Dies entspricht dem Maximum der roten Kurve bei 409 nm in Abbildung 106. Über einen Zeitraum von 20 Minuten stieg die Emission wieder bis auf ihren Ausgangswert an. Auch die Zugabe von 200 eq. DET hatte den gleichen Effekt, allerdings wurde der Ausgangswert der Intensität danach nicht mehr erreicht (Abbildung 107). Bei Betrachtung der zeitabhängigen Änderung der Emission des Dansylbausteins **67** zeigt sich ein anderes Bild (Abbildung 108). Hier sinkt die Emission über den gesamten Zeitraum, unabhängig von der Botenstoffzugabe kontinuierlich. Direkt nach Zugabe von jeweils 100 eq. DET sind kleine Sprünge in der Intensität zu beobachten. Mögliche Erklärungen für diese beobachteten Phänomene könnten folgende sein: Das kurzzeitige Absinken der Emission direkt nach der Zugabe des Botenstoffes und die leichte Verringerung der Gesamtemission über den gesamten Zeitraum könnten auf Trübungserscheinungen bzw. Lichtstreuungseffekte durch die Zugabe des DET zurückzuführen sein. Eine Energieübertragung war in diesem Fall nicht detektierbar.

Allerdings konnte eine gleichsinnige Abnahme bzw. Zunahme der Emission für den Dansyl- bzw. Tryptophanbaustein beobachtet werden. Hier lässt sich die Vermutung anstellen, dass die Transmembranbausteine innerhalb der Liposomen, während der Präparation zusammengeauf einen sehr geringen räumlichen Abstand gebracht wurden und es so kurzzeitig über die geringe räumliche Entfernung der Fluorophore, zu einem Energietransfer gekommen ist. Mit der Zeit equilibriert das System und geht in einen Gleichgewichtszustand über. Das Ausbleiben eines direkt messbaren FRET-Effekts lässt den Schluss zu, dass das Einlagerungsverhältnis der Transmembranrezeptoren zu klein ist. Die Bausteine sind innerhalb der Doppelschicht im Mittel zu weit voneinander entfernt, um einen stabilen Komplex mit dem DET auszubilden.

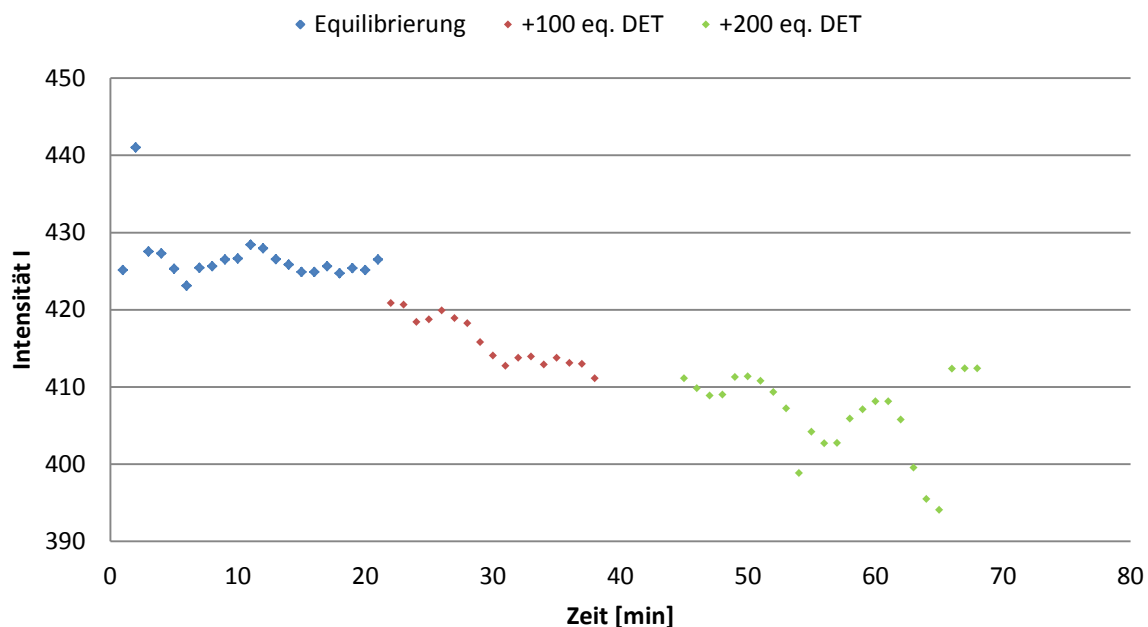


Abbildung 108: Intensitätsänderung der Dansylemission ($\lambda = 540$ nm) des Bausteins 67 vor und nach Zugabe des Botenstoffs (100 eq. DET und 200 eq. DET; 2 % Gesamtdotierung).

Die aussagekräftigsten Ergebnisse lieferte die Messung mit den 5 %-dotierten Liposomen. Auch hier konnte das schon bei den 2 %-dotierten Liposomen auftretende Phänomen beobachtet werden. Während der Equilibrierungsphase steigt die Emission des Rezeptors 83 kontinuierlich an, die des Rezeptors 67 hingegen nimmt kontinuierlich ab (Abbildung 109 und Abbildung 110). Dieser Effekt ist hier allerdings wesentlich deutlicher zu beobachten, als bei den 2 %-dotierten Liposomen. Zudem benötigte das System einen deutlich größeren Zeitraum, um in einen stabilen „Gleichgewichtszustand“ überzugehen. Hier scheint sich die vorige Annahme zu bestätigen, dass während der Extrusion der Liposomen die Bausteine 83 und 67 auf einen sehr geringen räumlichen Abstand gebracht werden und somit ein permanenter *Energie-Transfer* stattfindet.

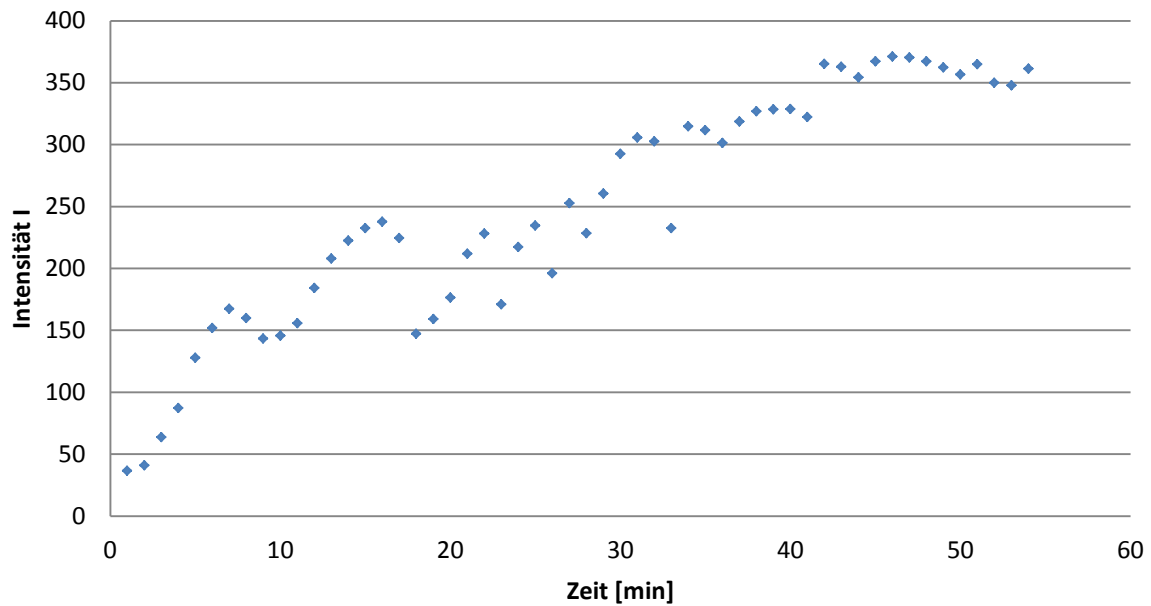


Abbildung 109: Intensitätsänderung der Emission ($\lambda = 409$ nm) des Bausteins 83 während der Equilibrierung.

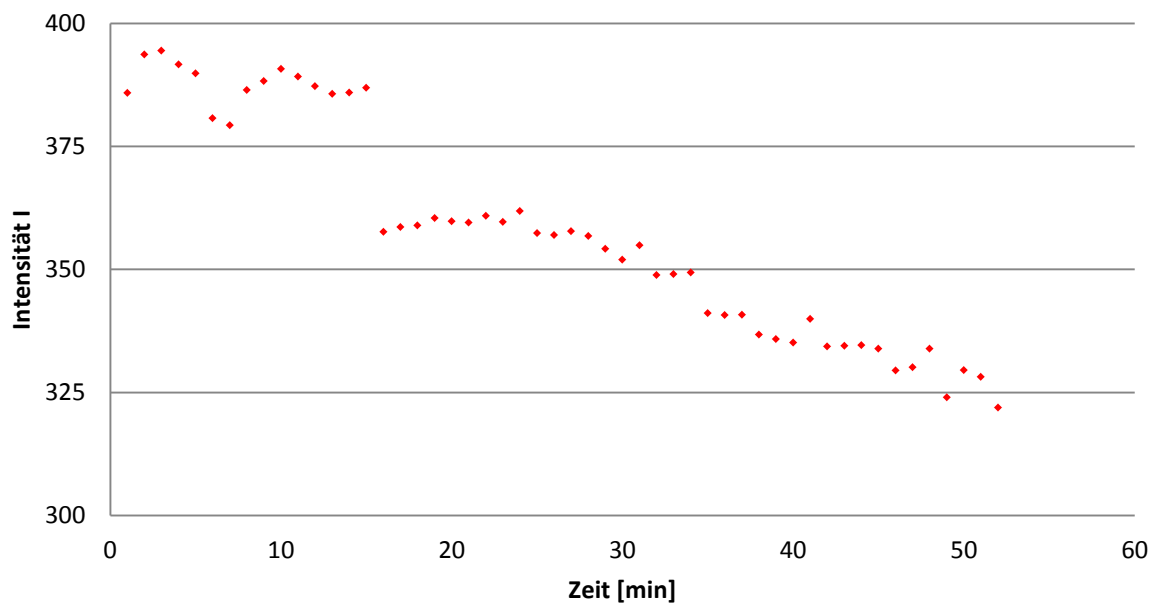


Abbildung 110: Intensitätsänderung der Emission ($\lambda = 540$ nm) des Bausteins 67 während der Equilibrierung.

Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob dieser Energietransfer bei Erreichen konstanter Emissionswerte vollständig zurückgegangen ist, sollte der Tryptophanbaustein **83** in einem späteren Kontrollexperiment in Abwesenheit des Akzeptorbausteins **67** in DPPC-Liposomen eingelagert werden und die Intensitätswerte am Emissionsmaximum des Donors verglichen werden. In Anwesenheit des Dansylbausteins **67** lässt sich nicht trennen, ob die Emission aus der Anregungswellenlänge selbst resultiert oder aus der Anregung durch die Tryptophanemission, da die Testmessungen (Abbildung 102) im Vorfeld gezeigt

hatten, dass auch bei niedrigen Wellenlängen eine Anregung des Dansylbausteins **67** detektiert werden kann. Auf die Zugabe von 100 eq. DET erfolgte in diesem Fall jedoch eine Abnahme der Tryptophanemission und eine Zunahme der Dansylemission. Der Vergleich der beiden Emissionsspektren in Abbildung 111 dokumentiert einen eindeutigen Energie-Trans-

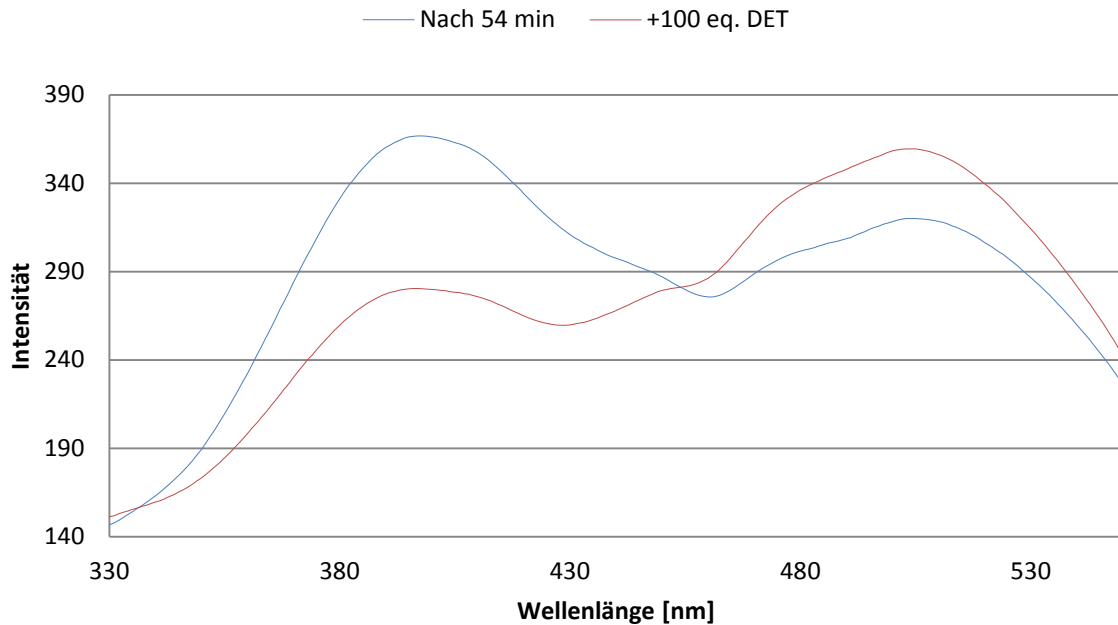


Abbildung 111: Signaltransduktionsexperimente mit den Transmembranbausteinen **83** und **67** (je 2,5 %) in DPPC-Liposomen.

fer. Durch die Zugabe des primären Botenstoffs DET bildet sich ein ternärer Komplex zwischen den Rezeptoren **83**, **67** und DET aus. Der räumliche Abstand zwischen den beiden

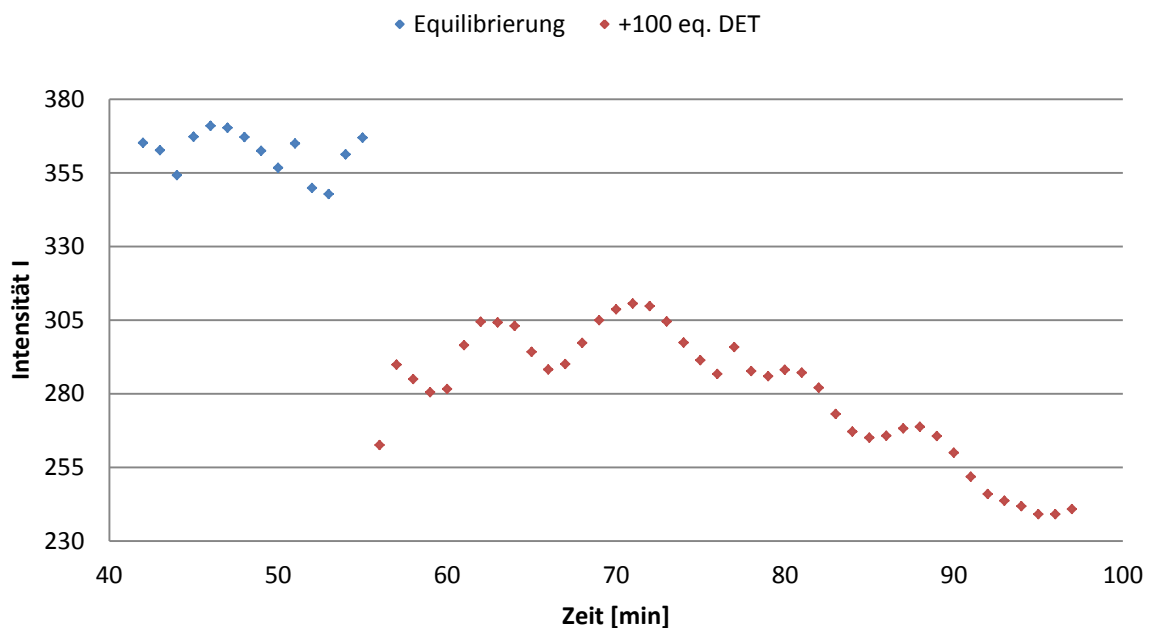


Abbildung 112: Intensitätsänderung der Tryptophanemission ($\lambda = 409$ nm) des Bausteins **83** vor und nach Zugabe des Botenstoffs (100 eq. DET; 5 % Gesamtdotierung).

Fluorophoren auf der Membranninnenseite verringert sich und ermöglicht einen Energietransfer. Betrachtet man die zeitabhängigen Spektren, so ist auch hier die Zunahme der Akzeptor- und die Abnahme der Donoremission eindeutig zu erkennen (Abbildung 112 und Abbildung 113). Auf die Zugabe von DET ändern sich die Emissionswerte sprunghaft. Zudem fällt auf, dass etwa 20 Minuten nach Zugabe des Botenstoffs, sowohl die Tryptophanemission, als auch für den Dansylemission, zurückgeht. Eine plausible Erklärung ist der Beginn einer möglichen Fällung des Komplexes aus dem wässrigen Medium. Allerdings konnte keine direkt auftretende Trübung der Lösung beobachtet werden.

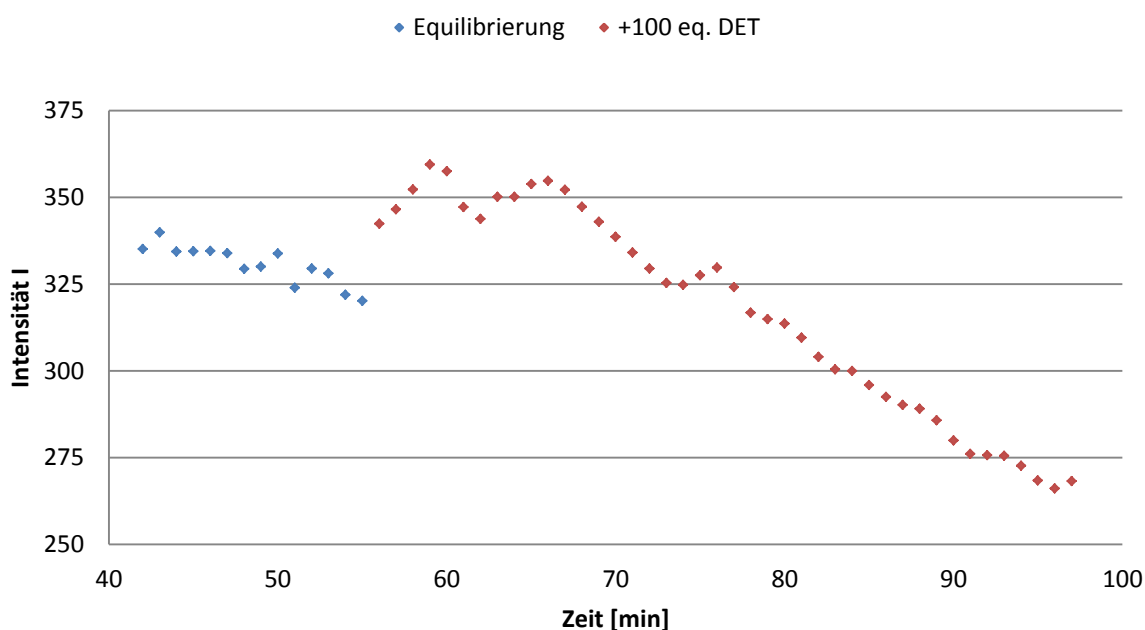


Abbildung 113: Intensitätsänderung der Dansylemission ($\lambda = 540$ nm) des Bausteins 67 vor und nach Zugabe des Botenstoffs (100 eq. DET; 5 % Gesamtdotierung).

In einem abschließenden Kontrollexperiment sollte überprüft werden, ob bei der Dotierung mit je 2.5 % der Transmembranbausteine **83** und **67** ein permanenter FRET-Effekt aufgrund einer zu hohen Dotierung mit den Transmembranbausteinen **83** und **67** vorliegt oder ob der beobachtete Energietransfer bei Erreichen konstanter Emissionswerte für die Donor- und Akzeptoremission vollständig zurückgegangen ist (Abbildung 109 und Abbildung 110). Hierzu wurden die Rezeptoren **83** und **67** mit einer Dotierung von jeweils 2.5 % in Abwesenheit des FRET-Partners eingelagert und über einen Zeitraum von 50 min equilibriert. Im Falle der Einlagerung von **83** sind nach der Equilibrierungsphase deutlich höhere Intensitätswerte am Emissionsmaximum ($\lambda = 409$ nm) im Vergleich zum eigentlichen Experiment zu beobachten. Dieser Sachverhalt deutet daraufhin, dass bereits ohne Zugabe des Botenstoffs ein Teil der Fluoreszenzenergie des Donors auf den Akzeptor übertragen wird. Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass der räumliche Abstand zwischen den beiden Bau-

steinen **83** und **67** im Liposom so gering ist, dass ein permanentes Signal detektiert werden kann. Somit ist die Gesamtdotierung von 5 % für die beiden Bausteine zu hoch gewählt. Der bei der Tryptophanemission beobachtete permanente FRET wird durch die analoge Mes-

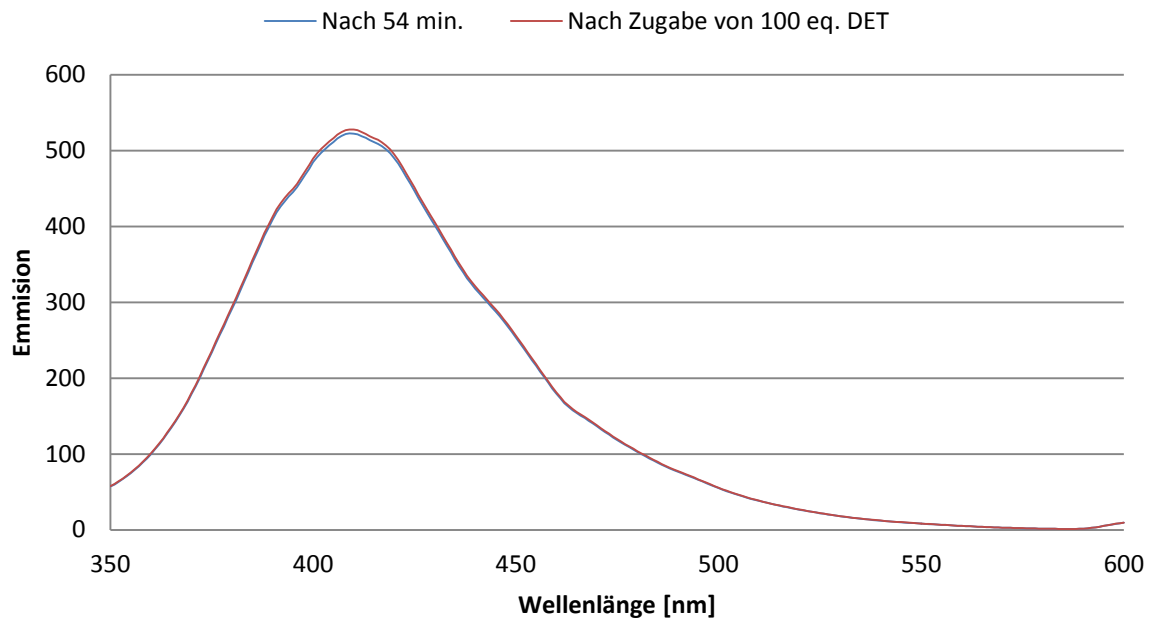


Abbildung 114: Kontrollexperiment mit dem Rezeptor 83 in DPPC-Liposomen (2.5 % Dotierung).

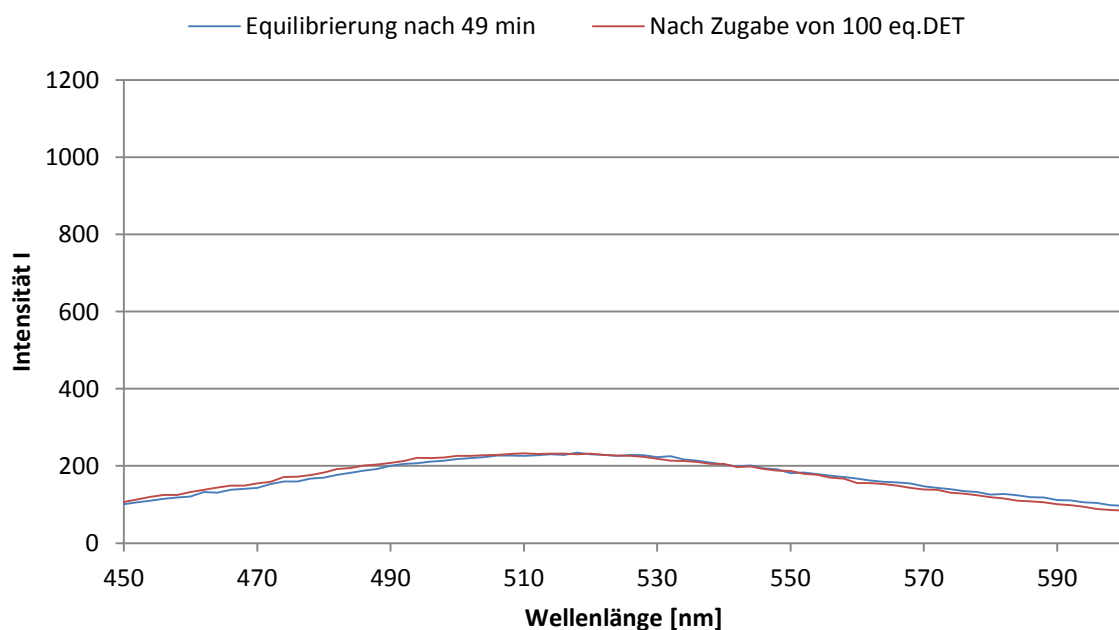


Abbildung 115: Kontrollexperiment mit dem Rezeptor 67 in DPPC-Liposomen (2.5 % Dotierung).

sungen mit dem Akzeptorbaustein **67** bestätigt. Die bei alleiniger Einlagerung gemessenen Intensitäten am Emissionssmaximum von 520 nm liegen unter den Werten im eigentlichen Signaltransduktionsexperiment (Abbildung 110 und Abbildung 111). Diese beobachtete er-

höhte Anregung des Dansylfluorophors kann nur aus einer Energieübertragung des Fluoreszenz-Donors resultieren. In beiden durchgeführten Kontrollexperimenten wurden zu den einzeln eingelagerten Bausteinen **83** und **67** ebenfalls 100 eq. des Botenstoffs DET zugegeben. In beiden Fällen resultiert aus der Zugabe keine Änderung der Intensitäten am jeweiligen Emissionsmaximum (Abbildung 114 und Abbildung 115). Somit konnte ein weiterer Hinweis erhalten werden, dass es sich bei dem beobachteten FRET-Effekt tatsächlich um eine Signalleitung, vermittelt durch den zugegebenen Botenstoff DET handelt. Während der Equilibrierungsphase wurden die Intensitäten der Emissionsmaxima über den gesamten Zeitraum verfolgt. Für den Rezeptor **83** erfolgt während dieser Zeit, ähnlich wie im eigentlichen Experiment, ein konstanter Anstieg der Fluoreszenzintensität (Abbildung 116). Für den

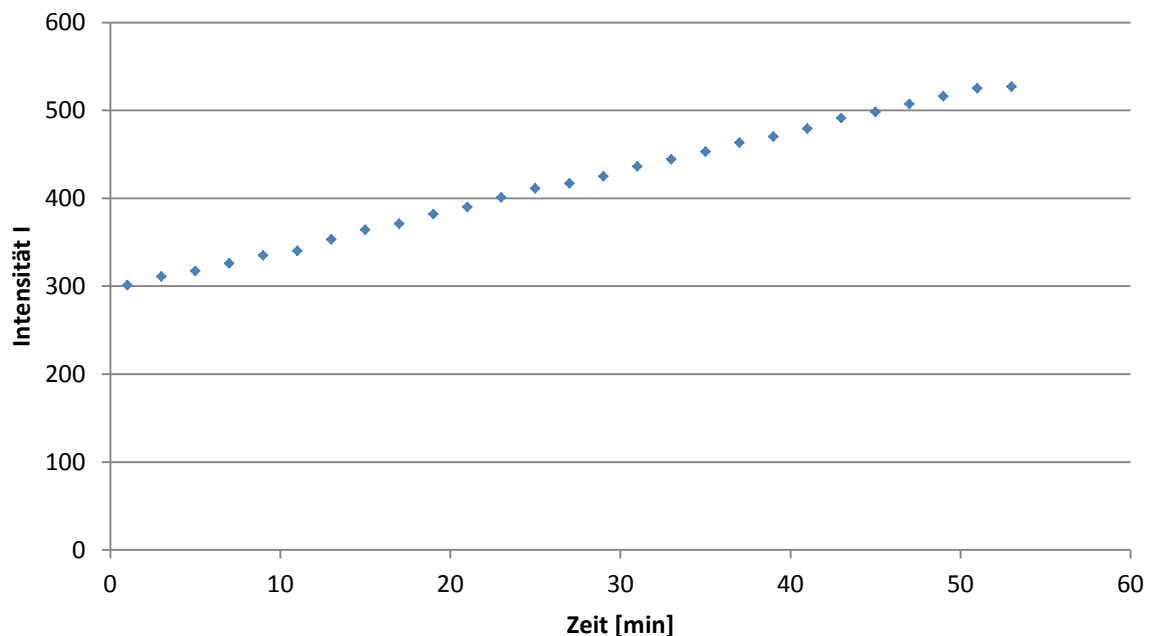


Abbildung 116: Intensitätsänderung der Tryptophanemission ($\lambda = 409$ nm) des Bausteins **83** während der Equilibrierung (2.5 % in DPPC).

Rezeptor **67** stellt sich hingegen bereits nach einer Minute ein eine konstante Fluoreszenzintensität ein, die über den gesamten Zeitraum erhalten bleibt (Abbildung 117). Für den Donor-Baustein **83** konnte der kontinuierliche Anstieg der Fluoreszenzemission im Signaltransduktionsexperiment selbst mit dem, direkt nach der Liposomenpräparation, zu geringen räumlichen Abstand der Bausteine **83** und **67** im Liposom begründet werden. Bei Abwesenheit des Rezeptors **67** muss die sich langsam aufbauende Fluoreszenzintensität allerdings durch andere Faktoren bedingt sein. Eine genauere Betrachtung und Interpretation der Ergebnisse erfolgt in Kapitel 3.3.4. Abschließende Testmessungen mit einer Gesamtdotierung von 10 % der Transmembranbausteine **83** und **67** zeigten, dass DPPC-Liposomen mit dieser erhöhten Dotierung nicht stabil sind. Direkt nach der Extrusion waren deutliche Trübungsef-

fekte zu beobachten. Die Emissionsspektren zeigten ebenfalls, dass die Rezeptoren **83** und **67** nicht in die Lipisomen eingelagert wurden.

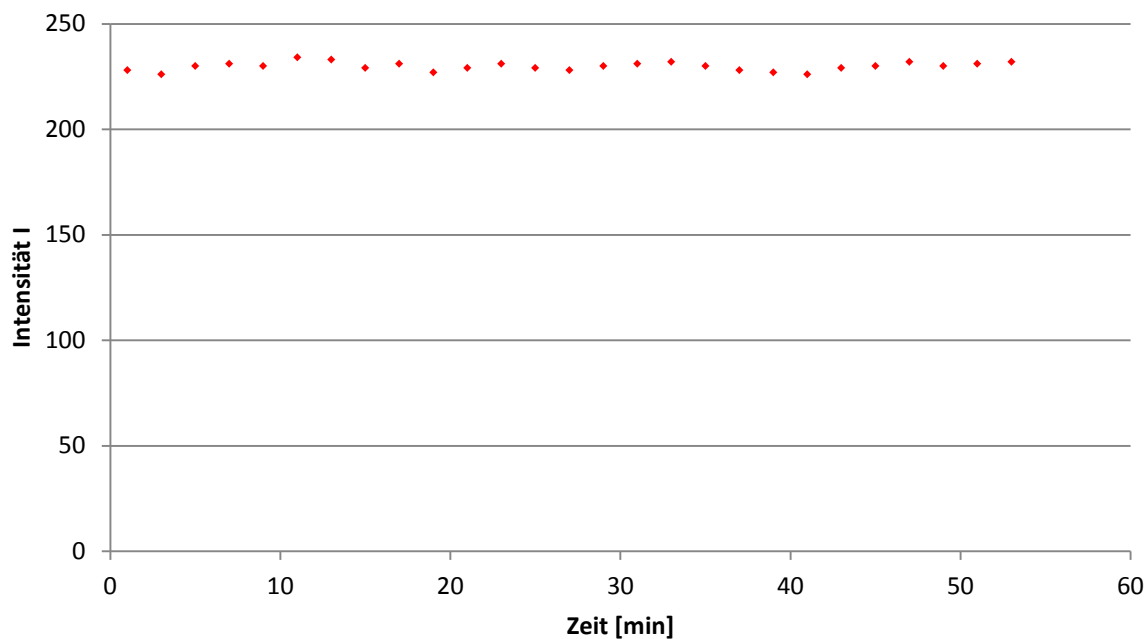


Abbildung 117: Intensitätsänderung der Dansylemission ($\lambda = 540 \text{ nm}$) des Bausteins **67** während der Equilibrierung (2.5 % in DPPC).

3.3.4 Auswertung und Interpretation der Ergebnisse

Die durchgeführten Testmessungen mit den Rezeptoren **83** und **67** konnten erste ermutigende Ergebnisse liefern, die auf eine funktionierende Signaltransduktion, induziert durch den Botenstoff DET, über eine DPPC-Doppelmembran, hinweisen.

Durch die Verwendung von drei unterschiedlich stark dotierten Liposomen konnte ein optimales Einlagerungsverhältnis abgesteckt werden. Die 2 %-dotierten Liposomen weisen einen zu geringen Anteil an Transmembranrezeptoren auf, da mit dieser Konzentration kein sichtbarer FRET-Effekt durch den Botenstoff DET induziert werden konnte. Die Dotierung mit 10 % der Transmembranbausteine **83** und **67** hat zur Folge, dass die präparierten Liposomen nicht mehr stabil sind. Aus den Messungen mit den 5 %-dotierten Liposomen konnten wichtige Erkenntnisse gewonnen werden. Es war zu beobachten, dass das System eine lange Equilibrierungszeit braucht, vermutlich weil die Transmembranbausteine bei der Extrusion der Liposomen auf einen sehr geringen räumlichen Abstand gebracht werden, der durch einen FRET-Effekt ohne Zugabe von Botenstoff sichtbar ist (Abbildung 109 und Abbildung 110).

Kontrollmessungen, bei denen die Bausteine **83** und **67** jeweils in Abwesenheit des FRET-Partners eingelagert wurden, zeigten, dass bei einer Gesamtdotierung von 5 % die Konzentration der Rezeptoren in der Doppelmembran zu hoch ist. Der nach der Präparation zu beobachtende Energie-Transfer geht auch nach einer langen Equilibrierungszeit nicht vollständig zurück (Abbildung 116 und Abbildung 117). Zudem konnte mit Hilfe der Kontrollmessungen gezeigt werden, dass der durch Zugabe des Botenstoffs DET induzierte FRET-Effekt nicht auf Quenching-Effekte oder Artefakte während der Messungen zurückzuführen sind, da die Zugabe des Botenstoffs zu den einzeln eingelagerten Rezeptoren **83** und **67** keine Änderung der Fluoreszenzintensitäten zur Folge hat (Abbildung 114 und Abbildung 115).

Eine weitere mögliche Erklärung für den, sich über einen Zeitraum von einer Stunde langsam einstellenden „Gleichgewichtszustand“ könnte in der, durch die Boc-Schutzgruppen bedingten erhöhten Lipophile der Tryptophan-Kopfgruppe des Rezeptors **83** begründet sein. Die lipophile Kopfgruppe könnte nach der Extrusion der Liposomenlösung im hydrophoben Bereich der Doppelmembran verankert sein und sich über einen längeren Zeitraum nur langsam in das wässrige, extra- bzw. intrazelluläre Kompartiment ausrichten. Dies wird durch die Beobachtung gestützt, dass die Tryptophanemission über den betrachteten Zeitraum stärker ansteigt, als die Dansylemission im gleichen Zeitraum abnimmt (Abbildung 109 und Abbildung 110).

Zudem deutet das langsame Erreichen eines stabilen Gleichgewichtszustands auf eine eingeschränkte Beweglichkeit der Rezeptoren **83** und **67** in der Membran hin. Diese mögliche verminderte laterale Beweglichkeit könnte durch das verwendete Liposomenmaterial DPPC verursacht werden. Dieses besitzt eine Phasenübergangstemperatur von 41 °C. Erst ab dieser Temperatur weist die Doppelmembran eine fluide Doppelschicht mit einem schnellen lateralen Austausch der Lipidmoleküle auf. Auch in die Membran eingelagerte Moleküle sollten erst ab dieser Temperatur ihre größtmögliche Mobilität erreichen. Da die Messungen bei 25 °C durchgeführt wurden, ist davon auszugehen, dass die Rezeptoren nicht ihre volle Beweglichkeit in der Membran erreichen konnten.

Die Zugabe des Botenstoffs zu dem, sich in einem stabilen Zustand befindlichen System, bestehend aus den Rezeptoren **83** und **67** in einer DPPC-Matrix, konnte einen Fluoreszenz-Energie-Transfer induzieren, der auf eine erfolgreiche Signaltransduktion hindeutet. Allerdings ist die unidirektionale und transmembrane Natur der Signalleitung zu diesem Zeitpunkt nicht bewiesen, da es für dieses System mehrere mögliche Konstellationen gibt, die eine erfolgreiche gerichtete Signalleitung vortäuschen können und als Ergebnis, die in

Abbildung 118 dargestellten Emissionsspektren zur Folge hätten. Die denkbaren Konstellationen und ihre Fehlerquellen sollen im Folgenden diskutiert werden.

Ein weiterer zu klärender Sachverhalt ist die eventuelle Permeabilität der DPPC-Membran für den eingesetzten Botenstoff DET. Ist die Membran für das DET nicht permeabel, befindet sich der Botenstoff nach der Zugabe ausschließlich im extrazellulären Medium.

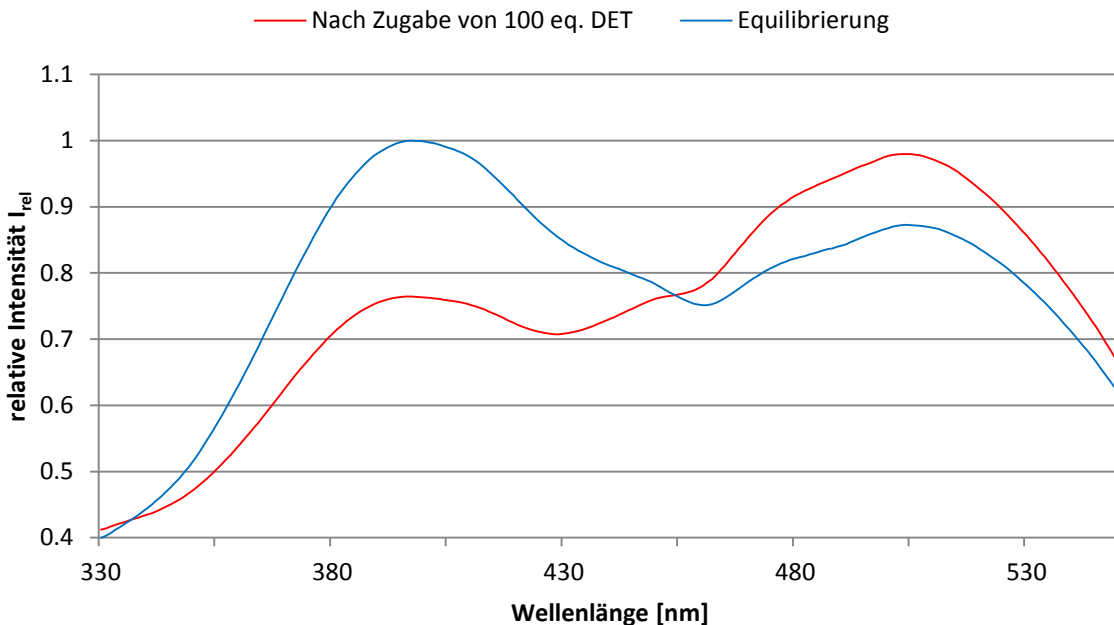


Abbildung 118: Signaltransduktionsexperimente mit den Transmembranbausteinen 83 und 67 (je 2.5 %) in DPPC-Liposomen (relative Intensitäten).

Aufgrund der statistischen Einlagerung der Transmembranbausteine sind in dieser Konstellation nur die auf der Außenseite der Membran befindlichen Bisphosphonat-Erkennungseinheiten für den Botenstoff zugänglich. Die Komplexierung der extrazellulären

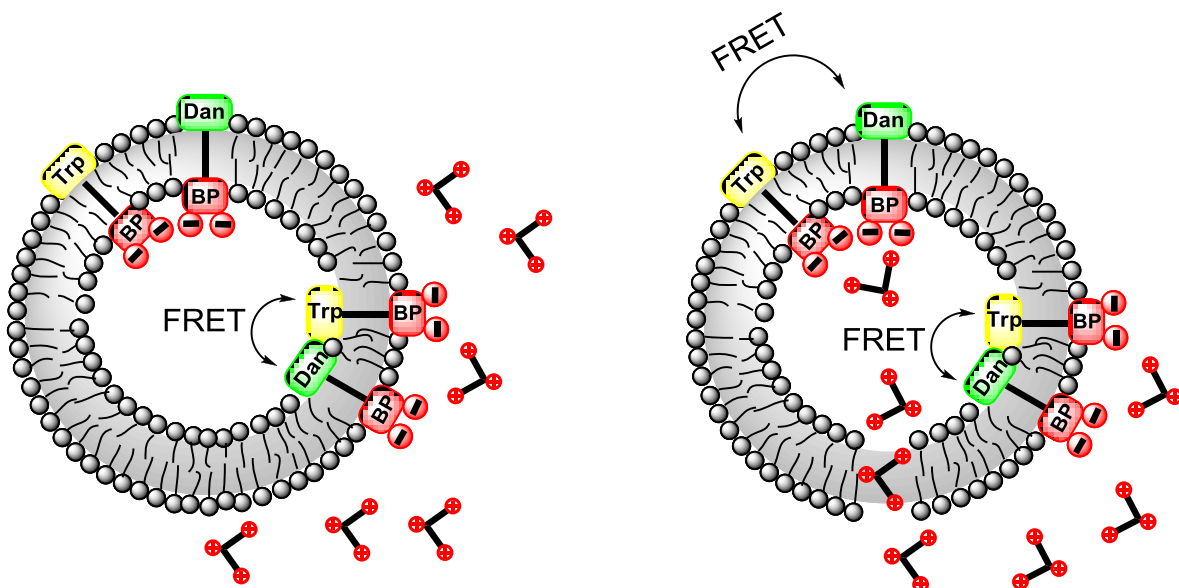


Abbildung 119: links: Unidirektionale Signalleitung bei einer für den Botenstoff nicht permeablen Membran; rechts: Unge-richtete Signaltransduktion im Fall eines membrangängigen Botenstoffs.

Erkennungseinheiten und die damit verbundene räumliche Annäherung der Rezeptoren induziert somit ausschließlich einen FRET-Effekt zwischen den Fluorophoren, die sich auf der Membraninnenseite befinden. Die Signalleitung ist in diesem Fall unidirektional (Abbildung 119 links). Kann der Botenstoff hingegen die Lipiddoppelschicht passieren, sind zusätzlich zu den Äußerer, auch die auf der Membraninnenseite verankerten Erkennungseinheiten für den Botenstoff zugänglich. In diesem Fall induziert der Botenstoff einen Energietransfer sowohl zwischen den extrazellulären, als auch zwischen den intrazellulären Fluorophoren. Die Signalleitung ist somit ungerichtet und müsste eine doppelt so große Intensitätsänderung der Fluoreszenzemissionen zu Folge haben, da somit nicht mehr nur ein sechstel, sondern ein Drittel der Rezeptoren zur Bildung produktiver Dimere befähigt ist (Abbildung 119 rechts).

Ein weiterer zu klärender Sachverhalt bezüglich einer echten gerichteten Signaltransduktion betrifft die Einlagerungsgeometrie der Transmembranrezeptoren **83** und **67**. Aufgrund der, in der Zentralregion der Rezeptoren **83** und **67** vorhandenen, frei rotierbaren Einzelbindungen, sind für die Transmembransegmente prinzipiell zwei unterschiedliche Einlagerungsgeometrien denkbar (Abbildung 120).

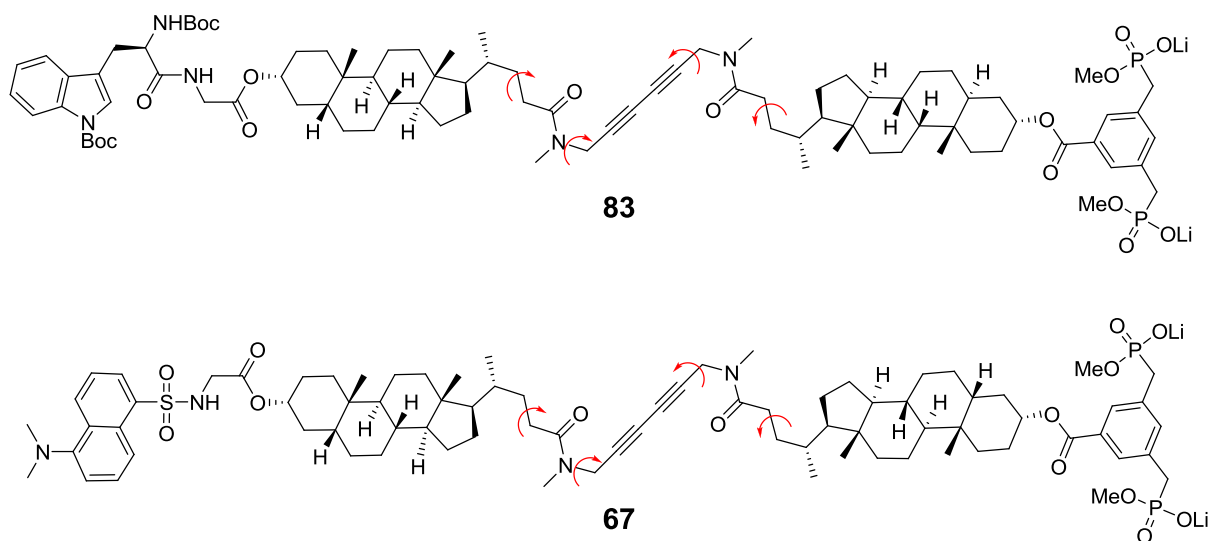


Abbildung 120: Frei drehbare Einzelbindungen in der Zentralregion der Transmembranbausteine **83** und **67**.

Für eine transmembrane Signalleitung müssen die Transmembransegmente in einer gestreckten, die Membran durchspannenden Anordnung in die Lipiddoppelschicht eingelagert sein (Abbildung 121 links). Nur in dieser Anordnung kann die extrazelluläre Bindung des Botenstoffs eine räumliche Annäherung der Fluoreszenzfarbstoffe auf der Innenseite der Membran induzieren. Die andere mögliche Einlagerungsform der Rezeptoren **83** und **67** würde zu einer „U-förmigen“ Geometrie der Transmembransegmente in der Lipidmatrix führen. In dieser Konstellation sind die Rezeptoren ausschließlich in einem Blatt der Lipid-

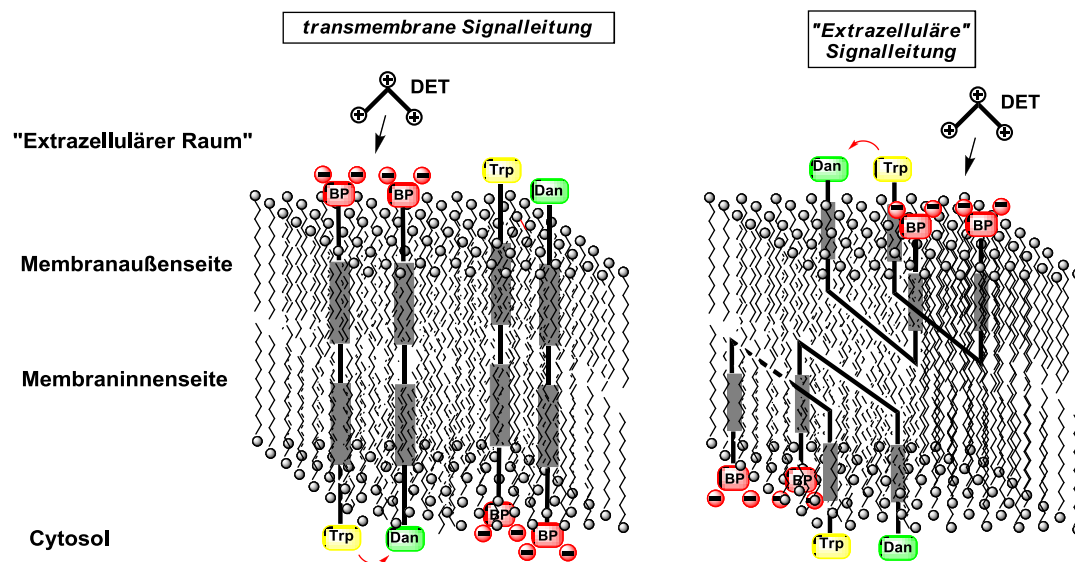


Abbildung 121: Mögliche Einlagerungsgeometrien der Transmembranbausteine 83 und 85.

doppelschicht verankert und sowohl die Erkennungseinheiten als auch die Fluorophore sind auf derselben Seite der Membran lokalisiert (Abbildung 121 rechts). Durch extrazelluläre Komplexierung des Botenstoffs kann es bei dieser Anordnung ebenfalls zu einer räumlichen Annäherung des Fluoreszenz-Donors und -Akzeptors kommen. Die Signalbildung erfolgt allerdings auf der gleichen Seite der Membran wie die Komplexierung des Botenstoffs und führt somit „nur“ zu einer extrazellulären Signalleitung. Die Unterscheidung dieser beiden Grenzfälle stellt ein größeres experimentelles Problem dar, da die Detektion nicht über ein einfaches Experiment erfolgen kann. Die Unterscheidung der beiden Einlagerungsgeometrien wird zusätzlich dadurch erschwert, dass statistisch gesehen die gleiche Anzahl an produktiven Rezeptor-Dimeren zu einer Signalbildung befähigt ist. Denkbar ist die Bestimmung mit Hilfe eines modifizierten Transmembranbausteins, der unter Abwesenheit der Erkennungseinheit, terminal sowohl mit einem Fluoreszenz-Donor, als auch mit einem Fluoreszenz-Akzeptor funktionalisiert ist. Die mögliche „U-förmige“ Einlagerung könnte dann über einen intramolekularen Energietransfer detektiert werden.

Abschließend sind noch zwei weitere experimentelle Situationen denkbar, die eine transmembrane Signaltransduktion vortäuschen können. Durch die statistische Einlagerung bedingt, sind auf der Außenseite der Liposomen sowohl Fluorophore als Erkennungseinheiten lokalisiert. Bisher wurde bei den angestellten Überlegungen davon ausgegangen, dass die Bildung des ternären Komplexes aus DET, **83** und **67** auf der Oberfläche eines Liposoms erfolgt (Abbildung 121 links). Prinzipiell kann die ternäre Komplexbildung aber auch durch Komplexierung zweier Bisphosphonat-Einheiten, die auf zwei unterschiedlichen Liposomen lokalisiert sind, durch den Botenstoff erfolgen (Abbildung 122). Die hierdurch bedingte Annäherung der Membranoberflächen führt folglich auch zu einem verringerten Abstand, der

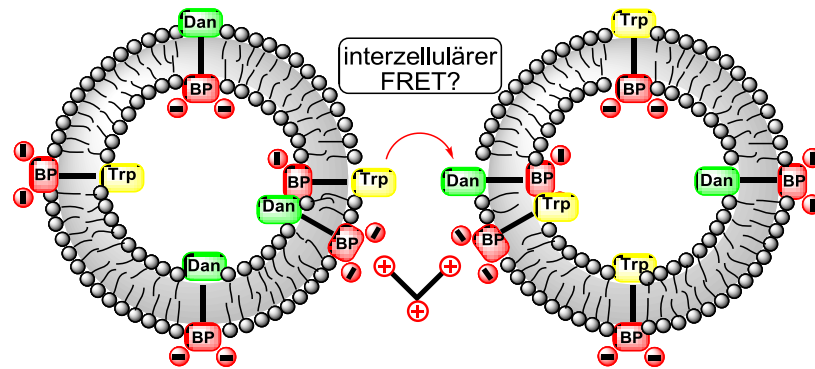


Abbildung 122: Schematische Darstellung eines möglichen interzellulären Energie-Transfers.

auf der Außenseite der Membranen befindlichen Fluoreszenzfarbstoffe und eröffnet die Möglichkeit eines interzellulären Energietransfers (Abbildung 122). Ob dieser Bindungsmodus einen Betrag zum gemessenen Signal liefert, kann durch ein geeignetes Referenzexperiment, bei dem die Rezeptoren **83** und **67** auf zwei verschiedene Liposomen separiert werden, mit geringem Aufwand nachgewiesen werden. Wird durch Zugabe des primären Botenstoffs DET ein FRET-Effekt induziert, kann das detektierte Signal nur durch Komplexbildung eines **83**-dotierten Liposoms, DET und eines **67**-dotierten Liposoms resultieren, da in den bereits erfolgten Referenzmessungen gezeigt werden konnte, dass die Bildung von Homo-Dimeren aus **83** und **83** bzw. aus **67** und **67** keine Änderung der Fluoreszenzintensitäten hervorruft (Abbildung 114 und Abbildung 115).

Abschließend ist eine experimentelle Situation möglich, die nicht den detektierten induzierten FRET-Effekt beeinflusst, sondern einen Beitrag zu dem gemessenen permanenten Energietransfer liefert. Unter der Voraussetzung, dass der Abstand der Fluorophore auf den unterschiedlichen Seiten der Membran nicht hinreichend groß ist, kann ein transmembraner FRET einen Beitrag zum permanenten Energietransfer liefern (Abbildung 123). Die Größe dieses möglichen Beitrags kann allerdings theoretisch berechnet werden und soll später noch näher betrachtet werden.

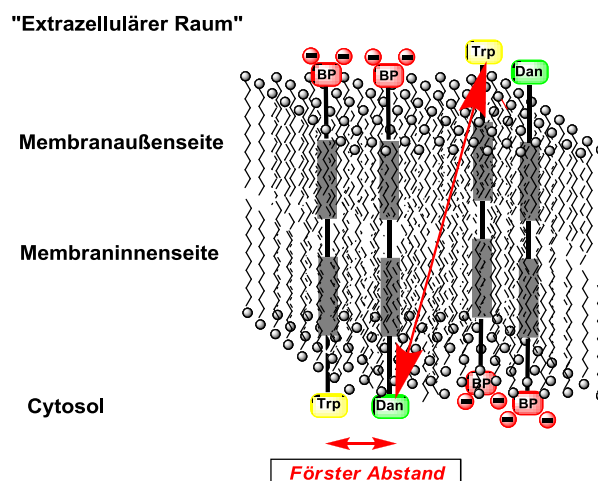


Abbildung 123: Möglicher transmembraner Energie-Transfer.

3.4 Optimierung und genauere Charakterisierung des Signaltransduktion

Aufgrund der Komplexität der künstlichen Signaltransduktion, soll das vorliegende System im Folgenden optimiert und detailliert untersucht werden. Auf Grundlage der bisher erzielten Ergebnisse und der im vorangegangenen Kapitel angestellten Überlegungen ist die weitere Vorgehensweise vorgegeben.

Das erste synthetische Ziel ist es, den Rezeptor **83** zu überarbeiten und einen tryptophangelabelten Transmembranbaustein **66** ohne Boc-Schutzgruppe am heterozyklischen Stickstoffatom herzustellen, um weiter voneinander entfernt liegende Emissionsmaxima betrachten zu können und vor allem die gleichzeitige Anregung des Tryptophans und des Dansylrestes zu minimieren. Zudem könnte über diesen modifizierten Rezeptor die, aufgrund der zusätzlichen Boc-Schutzgruppe, erhöhte Lipophile der Tryptophan-Einheit minimiert und so die schnellere Einstellung des „Gleichgewichtszustands“ erreicht werden. Die für das ungeschützte Tryptophan-Label zur Verfügung stehenden Literaturdaten für das bekannte und gut untersuchte FRET-Paar Tryptophan/Dansyl können helfen, die ablaufenden Prozesse während der Signalweitergabe besser zu verstehen.^[223,224]

Durch die erfolgten Testmessungen konnte bereits ein Bereich für die optimale Dotierung der Liposomen mit den Rezeptoren **83** und **67** abgesteckt werden. Mit Hilfe einer ganzen Serie von Messungen, in der die Dotierung sehr kleinschrittig verändert wird, soll in anstehenden Messungen das Optimum bezüglich der Dotierung bestimmt und der beobachtete permanente Energietransfer im „Gleichgewichtszustand“ des Systems minimiert bzw. im Idealfall eliminiert werden.

Die, auf Grundlage der bereits durchgeführten Experimente angestellten Überlegungen legten die Vermutung nahe, dass die Transmembranbausteine aufgrund des verwendeten Liposomenmaterials eine eingeschränkte laterale Beweglichkeit in der Membran besitzen. Das bisher verwendete Liposomenmaterial DPPC besitzt eine Phasenübergangstemperatur von 41 °C. Die aus diesem Material gebildete Lipiddoppelschicht weist somit erst ab dieser Temperatur eine signifikante Fluidität und eine damit verbundene hohe Beweglichkeit der eingelagerten Transmembranbausteine auf. Daher ist es sinnvoll die durchgeführten Experimente bei einer Temperatur oberhalb von 41 °C zu wiederholen. Eine weitere Möglichkeit, eine hohe Beweglichkeit der Rezeptoren in der Membran zu gewährleisten, ist der Ersatz des Liposomenmaterials durch ein Phosphatidylcholin mit kürzeren Alkylketten. Hierfür kommt das Derivat DMPC in Betracht, welches eine Phasenübergangstemperatur von 21 °C besitzt und somit bereits bei Raumtemperatur eine hohe Fluidität der Doppelmembran und eine damit verbundene hohe Beweglichkeit der Transmembranbausteine ge-

währleistet.

Um den Sachverhalt zu überprüfen, ob die Doppelmembran für den eingesetzten Botenstoff permeabel ist, gilt es ein geeignetes Experiment zu entwerfen. Geplant ist, den Botenstoff in ein Liposom zu inkludieren und zu prüfen, ob der Botenstoff im extrazellulären Medium nachzuweisen ist. Der Nachweis des Triamins DET soll über einen Ninhydrin-Farbassay erfolgen. Zudem müssen zu diesem Zweck neue Arbeitstechniken, wie die Reinigung von Liposomen und der Austausch des extrazellulären Puffers etabliert werden. Eines der wichtigsten Ziele der folgenden Untersuchungen besteht darin, zu klären, wie die Bausteine in den Liposomen eingelagert sind, um eine Aussage darüber treffen zu können, ob das Signal tatsächlich über die Membran geleitet wird oder ob die Signalleitung auf der extrazellulären Seite der Membran stattfindet. Im Idealfall sind die Transmembranbausteine in einer gestreckten Konformation in die Liposomen eingelagert, die das System zu einer transmembranen Signaltransduktion befähigt (Abbildung 121 links). Denkbar ist allerdings auch eine „U-Konformation“ der Transmembranrezeptoren in den Liposomen, bei der sowohl Erkennungseinheit, als auch Fluorophor auf der gleichen Seite der Membran liegen (Abbildung 121 rechts).

Zur Aufklärung dieses Sachverhalts sieht die Planung die Synthese eines neuen Transmembranrezeptors **85** vor. Dieser Rezeptor soll anstelle mit der Bisphosphonat-Erkenn-

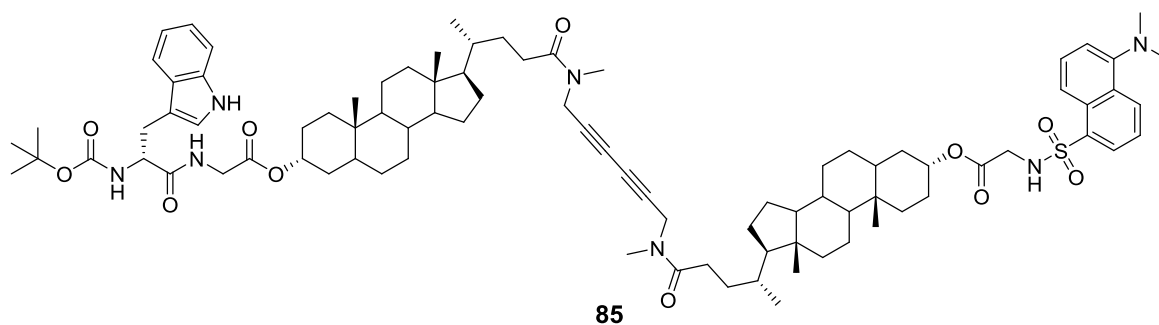


Abbildung 124: Synthese des unsymmetrischen Transmembranbausteins **85** mit Tryptophan-Donor und Dansyl-Akzeptor.

ungs-Einheit mit einen zweiten Fluoreszenzfarbstoff gelabelt werden und somit das FRET-Paar Tryptophan/Dansyl in einem Molekül vereinen. Für den Fall einer „U-förmigen“-Einlagerung sollte es bei dieser Konstellation bereits bei sehr geringen Konzentrationen des Rezeptors **85** in der Membran, zu einem intramolekularen FRET zwischen den terminalen Fluorophoren kommen. Im Fall der membrandurchspannenden Einlagerung sollte erst bei höheren Konzentrationen ein intermolekularer FRET zwischen zwei Transmembraneinheiten **85** detektierbar sein. Wie bereits im vorangegangenen Kapitel erwähnt, sollte das Auftreten eines interzellulären bzw. eines transmembranen, permanenten Energietransfers mit einfach zu bewerkstelligen Referenzmessungen zu beurteilen sein.

3.4.1 Synthese des Rezeptors **66** mit modifizierter Donor-Einheit

Eine mögliche Route für die Synthese des modifizierten *N*-heterozyklisch ungeschützten Transmembranrezeptors **66** sah die Kupplung eines orthogonal geschützten *N*-Boc-tryptophans mit dem Glycin-Linker zum Dipeptid vor. Dieses Dipeptid könnte im Folgenden an die sekundäre Alkoholfunktion eines bereits mit der Bisphosphonat-Erkennungseinheit funktionalisierten Lithocholsäure-Dimers gekuppelt werden. Durch Entfernen einer *N*-heterozyklischen Fmoc-Schutzgruppe und anschließender Spaltung der Phosphonsäuremethylester, wäre die Synthese des modifizierten Rezeptors **66** zu bewerkstelligen. Diese Route steht aber einer konvergenten Synthese unter Verwendung des schnell zu funktionalisierenden Gerüstbausteins **65** entgegen und würde außerdem einen deutlichen synthetischen Mehraufwand bedeuten.

Daher wurde zuerst versucht, dass bereits bei der Synthese des Rezeptors **83** eingesetzte HCTU-Protokoll zu modifizieren und die Nebenreaktionen des heterozyklischen Stickstoffatoms zu unterbinden.

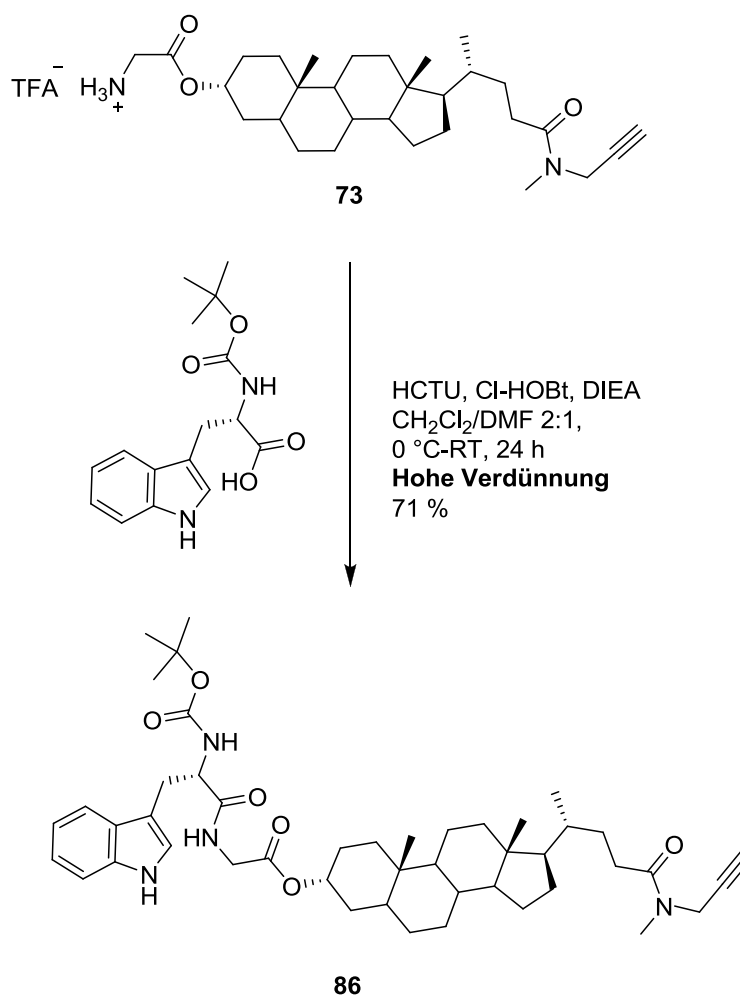


Abbildung 125: Synthese der Modellverbindung **86**.

Erste Testreaktionen wurden mit dem halben Baustein **73** durchgeführt (Abbildung 125). *N*-Boc-tryptophan wurde bei 0 °C in einem Gemisch aus Dichlormethan und *N,N*-Dimethylformamid vorgelegt. Zu der Aminosäure wurden über einen Zeitraum von 4 h das Kupplungsreagenz, die Additive und der Baustein **73**, ebenfalls in einem Gemisch aus Dichlormethan und *N,N*-Dimethylformamid gelöst, zu getropft. Durch diese Reaktionsfolge sollte die Konzentration an aktivierter Carbonsäure und primärem Amin **73** während der gesamten Reaktionszeit gering gehalten werden. Mit Hilfe dieser Modifikation konnte bereits die Modellverbindung **86** in guten Ausbeuten erhalten werden und die Bildung von Nebenprodukten fast vollständig unterdrückt werden. Nach diesen positiven Ergebnissen wurden *N*-Boc-tryptophan und der Gerüstbaustein **65** nach demselben Protokoll gekuppelt. Interessanterweise war die Ausbeute der Reaktion noch höher als in der vorangegangenen Testreaktion.

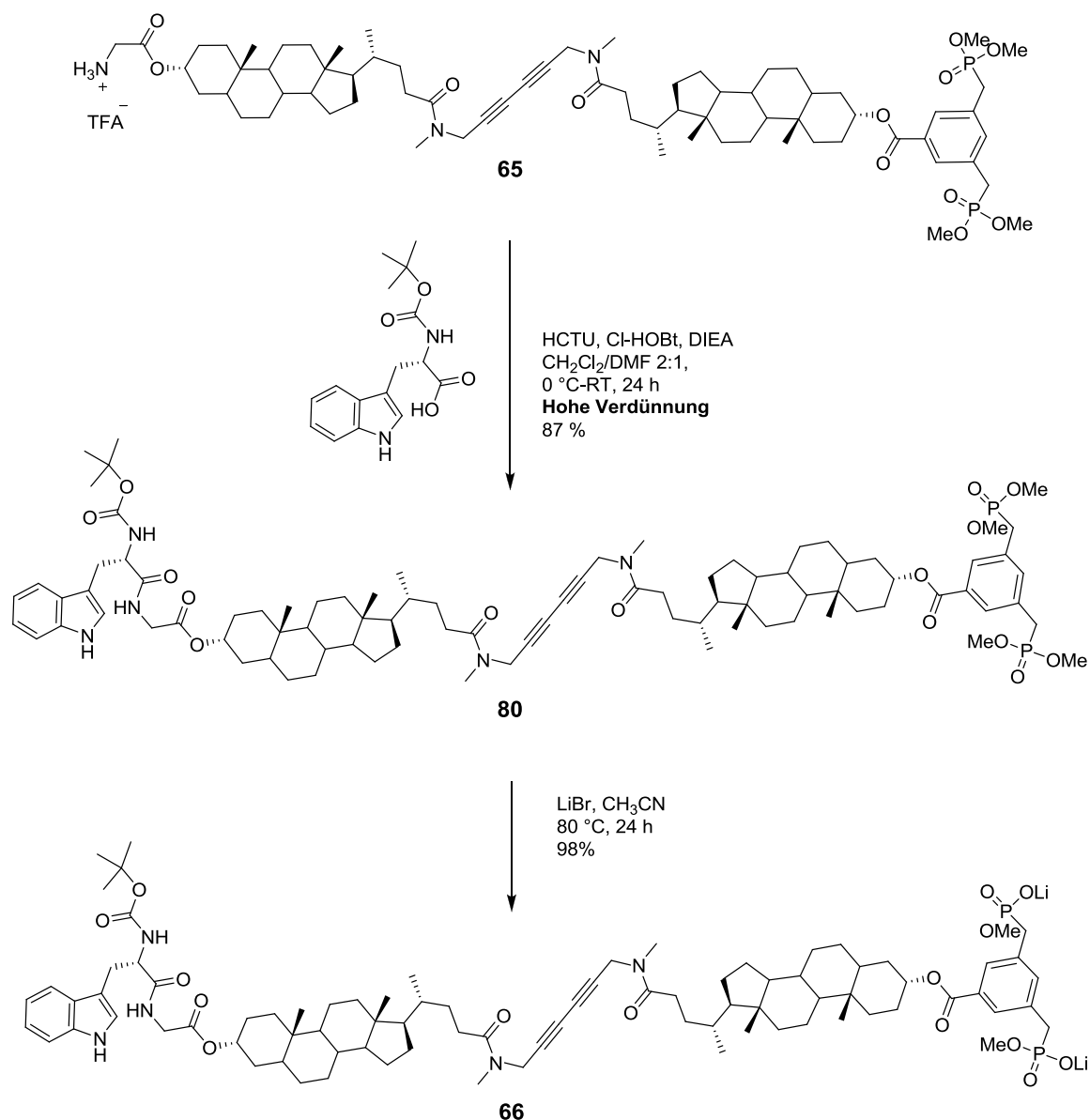


Abbildung 126: Synthese des modifizierten Rezeptors **66**.

Die Verbindung **80** konnte in sehr guten Ausbeuten und hoher Reinheit isoliert werden. Abschließend wurde nach dem Standardprotokoll zwei der Phosphonsäuremethylester des Transmembranbausteins **80** quantitativ mit Lithiumbromid gespalten und der Rezeptor **66** in hoher Reinheit isoliert. Abbildung 127 zeigt das ^1H -NMR-Spektrum des Transmembranrezeptors **66**.

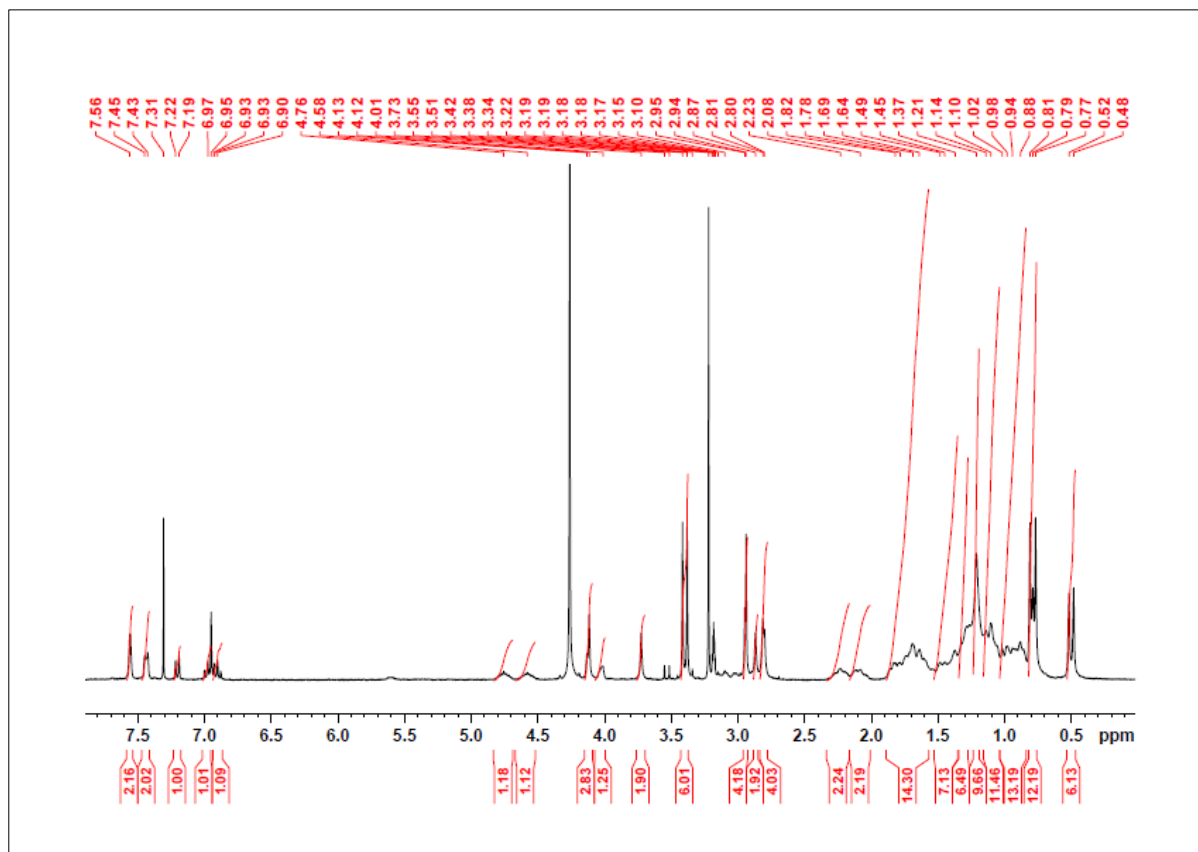


Abbildung 127: ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3): *N*-Boc-tryptophan-*N*-glycin-(lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-BP(OLi) $_2$ **66**.

3.4.2 Signaltransduktionsexperimente mit 66 und 67 in DPPC-Liposomen

Nach der erfolgreichen Synthese des modifizierten Rezeptors **66** wurden zuerst die veränderten spektroskopischen Eigenschaften des Rezeptors **66** untersucht. Abbildung 128 zeigt die Absorptions- und Emissionsspektren des Transmembranbausteins **66** in Methanol. Im Vergleich zum heterozyklisch geschützten Rezeptor **83** ist das Absorptionsmaximum um 15 nm zu niedrigeren Wellenlängen verschoben und entspricht mit 280 nm den Literaturdaten von freiem Tryptophan.^[225] Die Lage des Emissionsmaximums weist eine deutliche Differenz von 80 nm auf. Mit einem Maximum von 330 nm im Gegensatz zu 410 nm für den Rezeptor **83** ergibt sich für das System, bestehend aus den Bausteinen **66** und **67**, ein signifikanter Unterschied. Im Vergleich zu dem System aus **83** und **67** liegt das Emissionsmaximum der Fluoreszenz-Donor-Rezeptors **66** bei niedrigeren Wellenlängen als das Absorptionsmaximum des Fluoreszenz-Akzeptor-Rezeptors **67**. Hieraus resultiert zum einen ein größeres Überlappungsintegral $J(1)$ und zum anderen deutlich weiter voneinander entfernte Emissi-

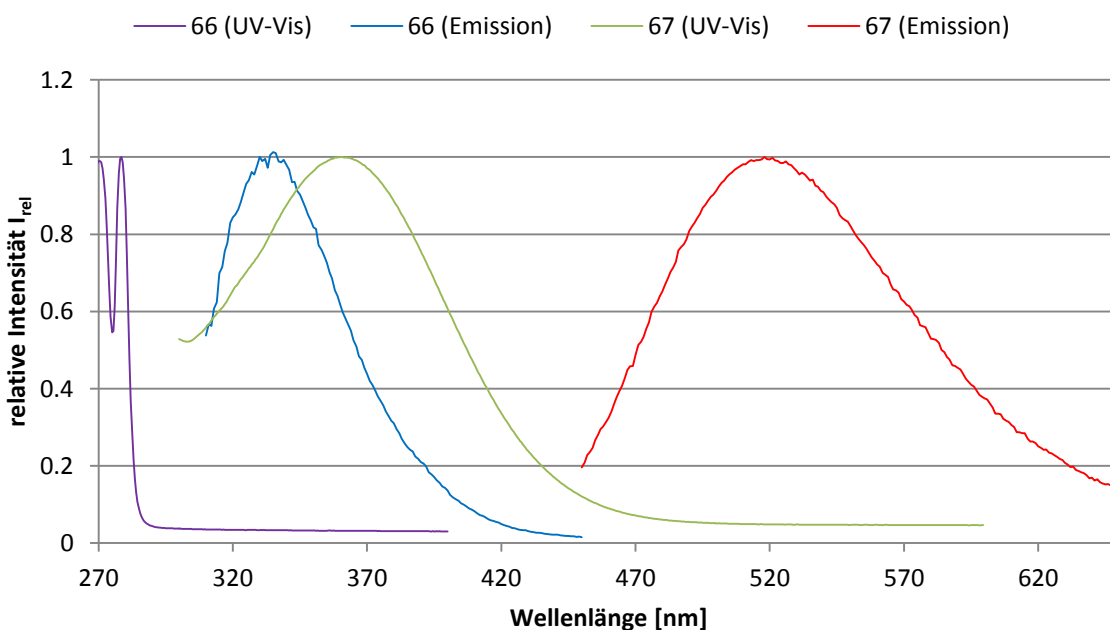


Abbildung 128: UV-Vis- und Fluoreszenzspektren der Transmembranbausteine **66** und **67** in MeOH.

onsmaxima.

Mit dem modifizierten Rezeptor **66** und dem Transmembranbaustein **67** wurden im Folgenden, nach dem bereits etablierten Protokoll, Liposomen mit einer Dotierung von je 2.5 % **66** und **67** präpariert. Auch für dieses System ist zu erkennen, dass sich die Tryptophanemission während der Equilibrierungsphase erst langsam aufbaut. Allerdings ist dieser Effekt deutlich geringer als im zuvor betrachteten Testsystem. Für die Rezeptorkombination aus **83** und **67** war die Tryptophanfluoreszenz zu Beginn der Equilibrierungsphase fast voll-

ständig gequenchet und erreichte im Gleichgewichtszustand relativ geringe Intensitätswerte (Abbildung 109). Für den Rezeptor **66** kann bereits direkt nach der Liposomenpräparation eine deutliche Fluoreszenzemission detektiert werden, die über einen Equilibrierungszeitraum von 90 min um etwa 20 % zunimmt (Abbildung 129 blau). Diese Beobachtung bestätigt die These, dass eine zweite lipophile Boc-Schutzgruppe im Fluoreszenz-Donor-Rezeptor **83** dazu führt, dass die Kopfgruppe nach der Liposomenpräparation zuerst im hydrophoben Bereich der Doppelmembran verankert ist und sich nur langsam in das extrazelluläre Medium ausrichtet. Die Fluoreszenzemission der Dansylbausteins **67** bleibt während der Equilibrierungsphase auf einem annähernd konstanten Niveau. Ein Abfall der Fluoreszenzintensität, wie es für das Testsystem aus **83** und **67** zu verzeichnen war, kann nicht beobachtet werden (Abbildung 129 rot). Dies deutet daraufhin, dass sich für die vorliegende Rezeptorkombination sehr schnell ein konstanter räumlicher Abstand in der Membran einstellt. Somit bleibt zu klären, ob der Verbleib der Boc-Schutzgruppe am primären Amin des Rezeptors **66** einen Beitrag zum gehemmten Aufbau der Tryptophanfluoreszenz liefert oder ob hierfür

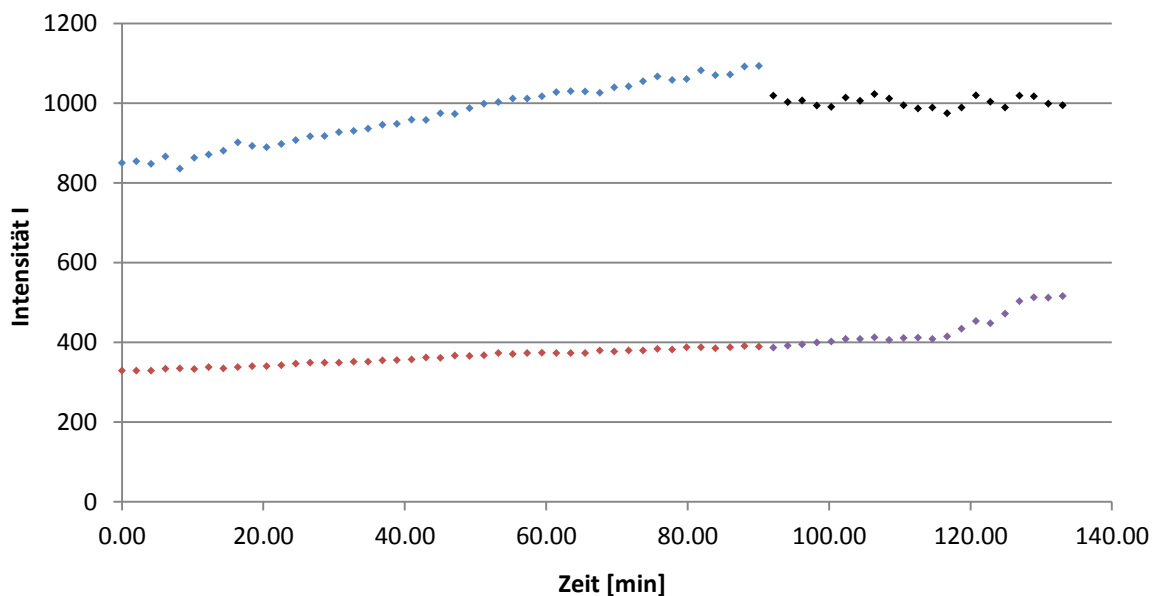


Abbildung 129: blau: 66 (Emission vor Zugabe von 100 eq. DET); schwarz: 66 (Emission nach Zugabe von 100 eq. DET); rot: 67 (Emission vor Zugabe von 100 eq. DET); violett: 67 (Emission nach Zugabe von 100 eq. DET).

andere Effekte verantwortlich sind. Zu der Liposomenlösung wurde nach 90 min der Botenstoff DET zugegeben. Auch in diesem Fall ist Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer direkt nach der Zugabe zu verzeichnen, der sich allerdings bezüglich der Dansylemission zeitverzögert aufbaut (Abbildung 129 violett). Die Zugabe des Botenstoffs hat eine Löschung der Tryptophanemission von 7 % zu Folge (Abbildung 130). Ein direkter Vergleich mit der Rezeptorkombination **83** und **67** ist nicht möglich, da für dieses System keine konstanten Fluor-

reszenzintensitäten einstellten. Unter Verwendung des Rezeptors **66** konnte sowohl vor, als auch nach der Zugabe von DET ein annähernd stabiles System erhalten werden. Zudem ist

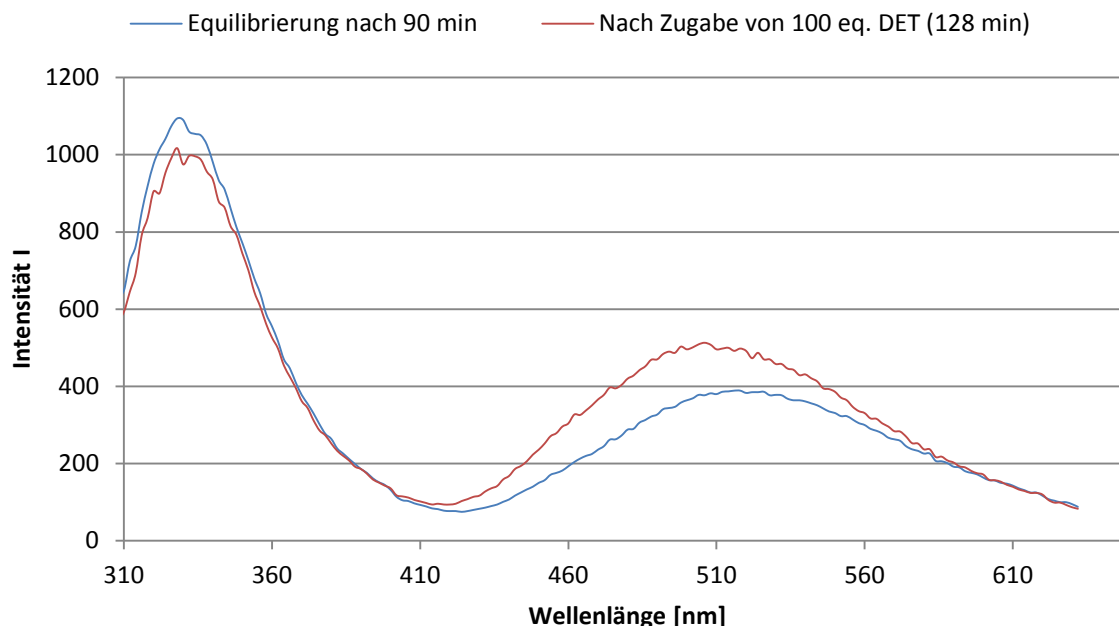


Abbildung 130: Emissionsspektren vor und nach Zugabe von 100 eq. DET (5 % in DPPC).

ein neuer Effekt zu beobachten.

Der Botenstoff induziert neben dem Energietransfer zusätzlich eine bathochrome Verschiebung des Akzeptor-Emissionsmaximums um 12 nm. Eine Verschiebung des Emissionsmaximums ist auf eine veränderte Polarität in der Umgebung des Fluorophors zurückzuführen. Eine direkte Wechselwirkung des Botenstoffs DET mit den auf der Außenseite der Membran lokalisierten Dansylfluorophoren des Rezeptors **67** ist als Ursache auszuschließen, da durch Referenzmessungen mit alleiniger Einlagerung des Bausteins **67** in DPPC-Liposomen gezeigt werden konnte, dass die Zugabe des Botenstoff keinen Einfluss auf die Fluoreszenzemission und die Lage des Emissionsmaximums hat (Abbildung 115). Auch scheidet eine veränderte Lokalisierung des Rezeptors **67** nach Zugabe des DET in der Membran als mögliche Ursache aus, da dieser Effekt ebenfalls in den Referenzmessungen zu beobachten sein müsste.

Eine mögliche Erklärung ist die Ausbildung eines, durch den verringerten Abstand der Rezeptoren **66** und **67** in der Membran induzierten Charge-Transfer-(CT)-Komplexes zwischen den aromatischen Systemen der beiden Fluorophore nach Zugabe des Botenstoffs. Das die Verschiebung des Emissionsmaximums für das System aus **83** und **67** nicht zu beobachten ist, kann durch eine sterische Hinderung des Indolsystem des Rezeptors **83** durch die heterozyklische Boc-Schutzgruppe begründet werden, die die Ausbildung eines solchen Charge-Transfer-(CT)-Komplexes verhindert.

3.4.3 Signaltransduktionsexperimente mit 66 und 67 bei erhöhter Temperatur

Um zu überprüfen, ob die hohe Phasenübergangstemperatur des verwendeten DPPC-Liposomenmaterials von 41 °C eine starke Einschränkung der lateralen Beweglichkeit der eingelagerten Rezeptoren **66** und **67** hervorruft und die Signaltransduktion behindert, wurden die Experimente mit den Bausteinen **66** und **67** bei einer Temperatur von 45 °C wiederholt. Bei dieser Temperatur befindet sich die DPPC-Doppelschicht in einem fluiden Zustand, so dass für die Transmembranbausteine **66** und **67** eine maximale laterale Beweglichkeit gewährleistet sein sollte (vgl. Kapitel 1.2). Die Fluoreszenzmessungen zeigten allerdings, dass die Temperaturerhöhung um 20 °C zu drastisch erniedrigten Fluoreszenzintensitäten im Vergleich zu den Experimenten bei Raumtemperatur führt (Abbildung 131 und Abbildung 132).

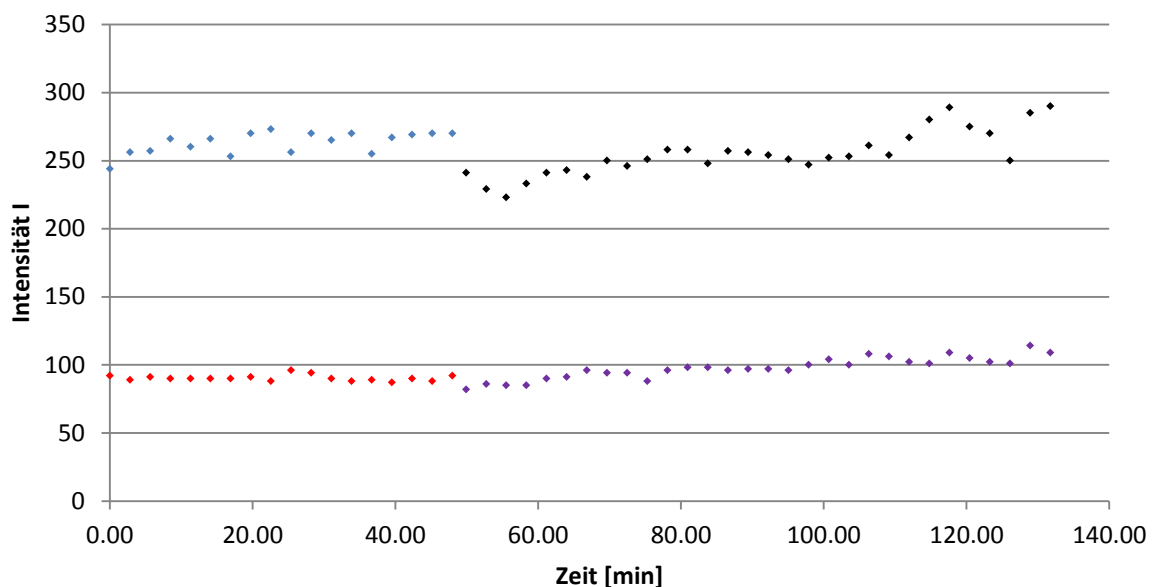


Abbildung 131: blau: 66 (Emission vor Zugabe von 100 eq. DET); schwarz: 66 (Emission nach Zugabe von 100 eq. DET); rot: 67 (Emission vor Zugabe von 100 eq. DET); violett: 67 (Emission nach Zugabe von 100 eq. DET) – Messung bei 45 °C.

Zudem ist der, durch die Zugabe des Botenstoffs DET, induzierte Resonanz-Energie-Transfer sehr gering. Für den Rezeptor **66** ist eine geringe Abnahme der Fluoreszenzemission zu beobachten, die Emission des Rezeptors **67** ist nach Zugabe des DET nahezu unverändert (Abbildung 131 und Abbildung 132). Die Abnahme der Fluoreszenzintensitäten ist bei einer Temperaturerhöhung zu erwarten, da Desaktivierungsprozesse, verursacht durch eine erhöhte Lösungsmittelrelaxation oder Stoßdeaktivierung vermehrt auftreten. Durch die erhöhte Beweglichkeit der Rezeptoren in der Membran sollte eigentlich eine größere Anzahl an Transmembranbausteinen befähigt sein, produktive Dimere auszubilden. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass eine Temperaturerhöhung zu einer deutlich erniedrigten Bin-

dungskonstante für den ternären Komplex aus den Bisphosphonatpinzetten und DET führt.

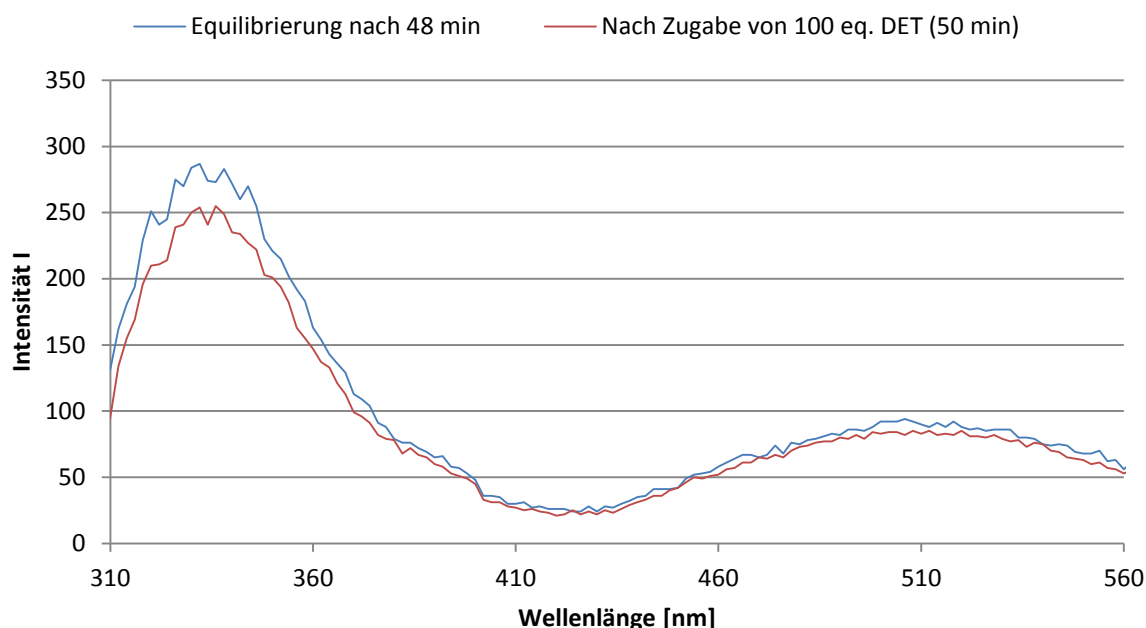


Abbildung 132: Emissionsspektren vor und nach Zugabe von 100 eq. DET (5 % in DPPC) – Messung bei 45 °C.

Offensichtlich sind die bindenden Wechselwirkungen soweit herabgesetzt, dass es bei einer Temperatur von 45 °C zu keiner hinreichenden räumlichen Annäherung der Transmembranbausteine **66** und **67** kommt. Mit Hilfe dieses Experiments konnte allerdings ein weiterer Hinweis erhalten werden, dass die Kopfgruppen der Rezeptoren **66** und **67** nach der Liposomenpräparation tatsächlich in der Membran verankert sind und sich erst zeitverzögert in das wässrige Medium ausrichten. Betrachtet man die Fluoreszenzintensitäten des Fluoreszenz-Donors **66** während der Equilibrierungsphase, so ist zu erkennen, dass die Temperaturerhöhung zu annähernd konstanten Intensitätswerten führt (Abbildung 131 blau). Dies deutet daraufhin, dass durch die erhöhte Fluidität der Membran die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen der Kopfgruppe des Rezeptors **66** und den Lipidmolekülen der Membran herabgesetzt werden und der Tryptophanrest direkt nach der Liposomenpräparation frei beweglich in das wässrige Medium ausgerichtet ist. Die Temperaturerhöhung führte nicht zu der erhofften Steigerung des induzierten Signals.

Daher scheint es sinnvoll, das System auf anderem Wege zu optimieren. Als erstes sollte in weiteren Experimenten mit DPPC-Liposomen das optimale Einlagerungsverhältnis der Transmembranbausteine **66** und **67** ermittelt werden. Mit dieser optimierten Rezeptorkonzentration sollten dann Experimente mit einem alternativen Liposomenmaterial (DMPC) durchgeführt werden, dessen Phasenübergangstemperatur unterhalb von 25 °C liegt, um so eine erhöhte Beweglichkeit der Rezeptoren in der Membran zu erreichen.

3.4.4 Variation der Membrandotierung

Durch die erfolgten Testmessungen mit den Rezeptoren **83** und **67** konnte bereits ein Bereich für die optimale Dotierung (etwa 2.5 %) der Doppelmembran abgesteckt werden. Durch eine kleinschrittige Veränderung der Dotierung sollte in den folgenden Experimenten das Optimum bezüglich der Dotierung bestimmt werden und der beobachtete permanente Energietransfer im „Gleichgewichtszustand“ des Systems minimiert bzw. im Idealfall eliminiert werden. Hierzu wurde die Gesamtdotierung der Liposomen auf 4 % bzw 3 % erniedrigt und die Signaltransduktionsexperimente nach dem etablierten Protokoll durchgeführt. Die Experimente für die mit je 2.0 % der Rezeptoren **66** und **67** dotierten DPPC-Liposomen zeigten, dass der durch Zugabe des primären Botenstoffs DET induzierte FRET dem entspricht, der schon für das System mit einer Gesamtdotierung von 5 % beobachtet werden konnte (etwa 7 % Abnahme der Tryptophanemission - Abbildung 133). Allerdings ist der induzierte FRET nicht stabil. Die Beobachtung der Intensitätswerte der Emissionsmaxima über einen längeren Zeitraum zeigt, dass der induzierte Energietransfer bereits kurz nach Zugabe des Botenstoffs wieder zurückgeht. Referenzmessungen mit dem Transmembranbaustein **66** ergaben zudem, dass der permanente Energietransfer vor Zugabe des DET durch die Erniedrigung der Membrandotierung nicht vollständig eliminiert werden konnte (Abbildung 133 violett). Eine weitere Erniedrigung der Rezeptorkonzentration auf je 1.5 % der Transmembranbausteine **66** und **67** führte ebenfalls nicht zu einer gesteigerten Signalübertragung. Zwar konnte der permanent detektierbare Energietransfer zwischen den Rezep-

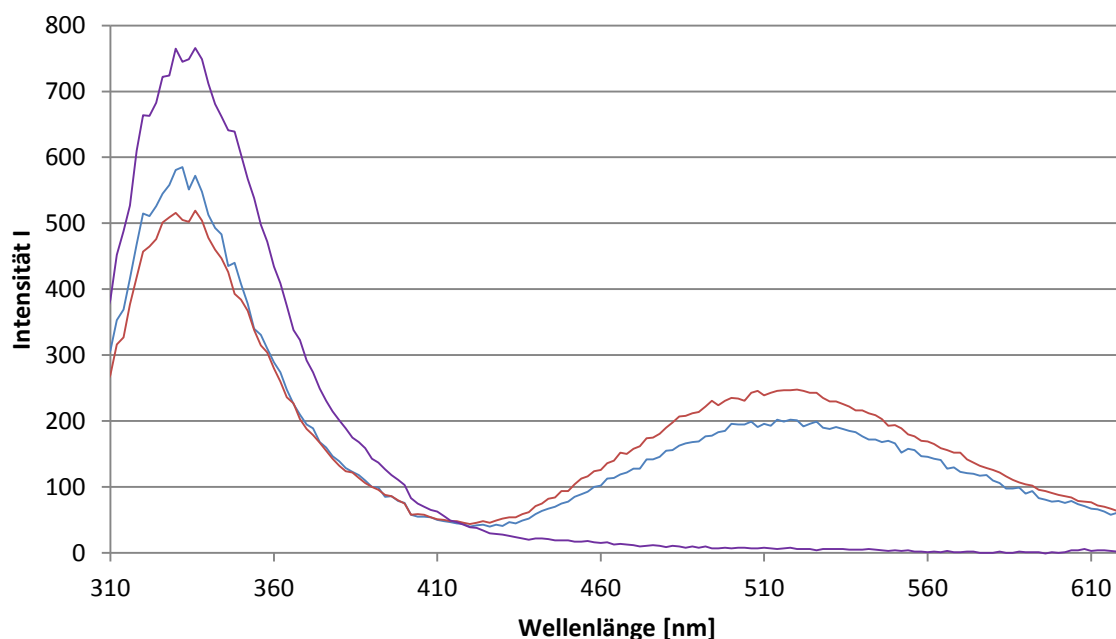


Abbildung 133: blau: Emissionsspektrum vor Zugabe von 100 eq. DET (4 % in DPPC); rot: Emissionsspektrum vor Zugabe von 100 eq. DET (4 % in DPPC); violett: Emissionsspektrum des Rezeptors 66 (2 % in DPPC).

toren **66** und **67** fast vollständig unterbunden werden, jedoch führte die Zugabe des Botenstoffs DET zu keinem induzierten FRET und somit auch zu keiner Signaltransduktion (Abbildung 134). Der leichte Rückgang der Tryptophanemission ist auf Trübungserscheinun-

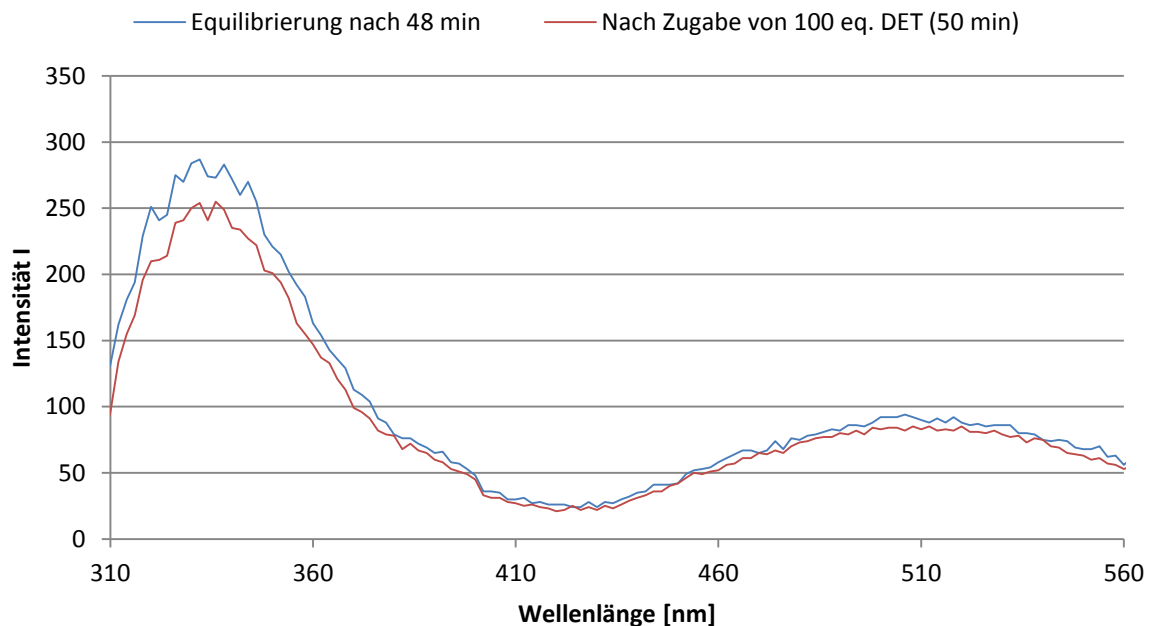


Abbildung 134: Emissionsspektren vor und nach Zugabe von 100 eq. DET (3 % in DPPC).

gen der Liposomenlösung zurückzuführen, da für einen induzierten FRET ein simultaner Anstieg der Dansylemission zu verzeichnen sein müsste.

Die Erniedrigung Membrandotierung der DPPC-Liposomen lieferte nicht die erhoffte Steigerung des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers, induziert durch die Zugabe des Botenstoffs DET. Es konnte zwar gezeigt werden, dass eine geringere Dotierung der Membran zu einer Abnahme des permanenten Energietransfers vor Zugabe des DET führt, dies aber gleichzeitig auch eine geringere Signalleitung zur Folge hat bzw. im Falle einer Dotierung mit 1.5 % keine Signalübertragung mehr detektiert werden kann. Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass eine Dotierung der Membran mit 2.5 % der Rezeptoren **66** und **67**, dass optimale Einlagerungsverhältnis darstellt. Bei dieser Rezeptorkonzentration kann unter den gegebenen Bedingungen die größtmögliche Signalübertragung erzielt werden. Hierbei muss allerdings berücksichtigt werden, dass ein geringer Anteil der Transmembranbausteine aufgrund des, durch die räumliche Nachbarschaft der Rezeptoren bedingten, permanenten FRET für die eigentliche Signaltransduktion nicht mehr zur Verfügung steht.

Da das Hauptaugenmerk bei diesem Modellsystem aber auf dem prinzipiellen Nachweis einer transmembranen, unidirektionalen Signaltransduktion liegt, soll dieser Sachverhalt gebilligt werden, da eine klare Unterscheidung der Effekte bewiesenermaßen möglich ist.

3.4.5 Verwendung von DMPC als Liposomenmaterial

Erste Optimierungsversuche, eine erhöhte Mobilität der Transmembranbausteine in der Lipiddoppelschicht durch Erhöhung der Temperatur und einer damit verbundenen Änderung des Phasenzustandes der DPPC-Membran herzustellen, lieferten nicht die gewünschten Ergebnisse, da die Temperaturerhöhung der Ausbildung des ternären Komplexes aus den Bisphosphonat-Erkennungseinheiten und dem DET entgegenwirkte.

Aus diesem Grund sollte das bisher verwendete Liposomenmaterial DPPC, durch ein Liposomenmaterial ersetzt werden, dass unter Beibehaltung der membranbildenden Eigenschaften, eine deutlich erniedrigte Phasenübergangstemperatur aufweist. Hier wurde im Folgenden DMPC verwendet, ein Phosphatidylcholin mit einer, im Gegensatz zu DPPC um zwei Kohlenstoffeinheiten verkürzten Alkylkette. Die Phasenumwandlungstemperatur von DMPC liegt bei 21 °C. Somit können die Signaltransduktionsexperimente bei 25 °C in einer fluiden Membran durchgeführt werden, womit gewährleistet sein sollte, dass die Rezeptoren eine hinreichend freie Beweglichkeit in der Membran besitzen.

In einem ersten Experiment wurden die Rezeptoren **66** und **67** in ein DMPC-Liposom eingelagert und die Intensitäten der Emissionsmaxima von Rezeptor **66** und **67** simultan verfolgt. Im Gegensatz zu den hergestellten DPPC-Liposomen, liegen die Werte der Fluoreszenzintensitäten in der DMPC-Membran für den Donor **66**, bei mehr als doppelt so hohen Werten. Für den Akzeptor **67** können sogar viermal so hohe Intensitäten detektiert werden (Abbildung 135). Dies deutet bereits auf eine deutlich gesteigerte Beweglichkeit der Rezep-

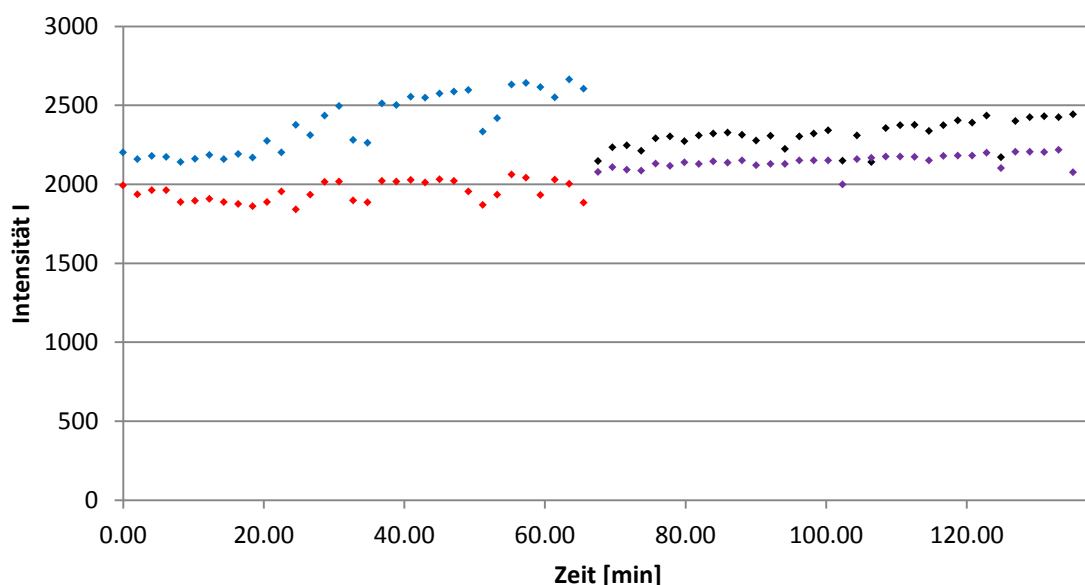


Abbildung 135: blau: 66 (Emission vor Zugabe von 100 eq. DET); schwarz: 66 (Emission nach Zugabe von 100 eq. DET); rot: 67 (Emission vor Zugabe von 100 eq. DET); violett: 67 (Emission nach Zugabe von 100 eq. DET).

toren **66** und **67** in der DMPC-Membran und eine veränderte Polarität der Umgebung hin. Betrachtet man allerdings die Konstanz der Intensitäten, so zeigen sich deutlich schwankende Intensitätswerte über den gesamten Equilibrierungszeitraum von einer Stunde. Zudem ist wiederum der Effekt der sich langsam aufbauenden Tryptophanemission zu beobachten. Für diese wird im Vergleich zu den DPPC-Liposomen, aber nach einer kürzeren Zeit, ein annähernd gleichbleibendes Niveau erreicht. Dies steht im Einklang mit den Beobachtungen, die für die Messungen des DPPC-Systems bei erhöhter Temperatur gemacht wurden. Durch die erhöhte laterale Beweglichkeit der Rezeptoren in der Membran erfolgt die Ausrichtung der Tryptophan-Kopfgruppe deutlich schneller.

Auch für dieses System kann durch Zugabe des Botenstoffs DET ein induzierter FRET eindeutig nachgewiesen werden. Durch die Zugabe erfolgt ein simultaner Abfall der Tryptophan-, bzw. Anstieg der Dansylemission (Abbildung 136). Die Intensitätswerte bleiben über einen Zeitraum von einer Stunde auf einem konstanten Niveau und liefern ein stabiles Signaltransduktionssystem im aktivierten Zustand (Abbildung 135).

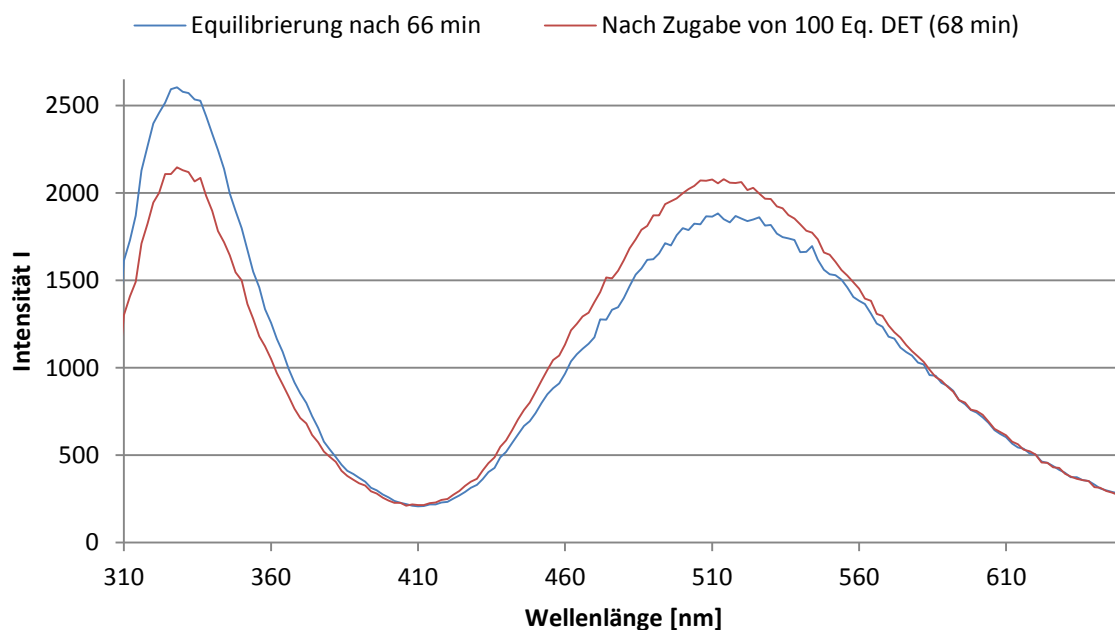


Abbildung 136: Emissionsspektren vor und nach Zugabe von 100 eq. DET (5 % in DMPC).

Zudem ist die Signalübertragung bezüglich der Abnahme der Tryptophanemission mit 18 % doppelt so hoch, wie für das äquivalente DPPC-System. Die stärker schwankenden Emissionswerte der Donor- und Akzeptor-Emission lassen sich eventuell über das Design der Transmembranbausteine **67** und **68** erklären. Der Kopf-zu-Kopf-Abstand der Transmembranrezeptoren ist so ausgelegt, dass das Transmembransegment inklusive der angeknüpften Linker dem Durchmesser einer DPPC-Doppelmembran von 36 Å entspricht.^[217]

Durch die Verwendung von DMPC als Liposomenmaterial verringert sich der Durchmesser der Membran auf 31 Å.^[217] Somit sind bei einem verringerten Membrandurchmesser sowohl die Fluorophore, als auch die Erkennungseinheiten nicht mehr direkt auf der Membranoberfläche verankert, sondern können sich flexibel im umgebenden wässrigen Medium bewegen. Denkbar ist, dass die Fluorophore einen ständigen Wechsel der Umgebung zwischen der Membranoberfläche und dem wässrigen, gepufferten Medium vollführen. Hieraus resultiert ein permanenter Wechsel der Polarität, was wiederum zu den sich stark ändernden Fluoreszenzintensitäten führt. Durch den Wechsel des Liposomenmaterials konnten erste Erfolge zur Steigerung der Signaltransduktion erzielt werden. Zum einen konnte die Energie-Transfer-Effizienz im Gegensatz zum System **66-67** in DPPC-Liposomen auf das doppelte erhöht werden. Zum anderen konnte durch die Verwendung von DMPC der langsame Aufbau der Tryptophanemission nach der Liposomenpräparation minimiert werden. Der einzige Nachteil liegt in der verringerten Stabilität der Emissionswerte vor und nach der Zugabe des primären Botenstoffs.

Um das System, bestehend aus den Rezeptoren **66** und **67** in einer DMPC-Matrix bezüglich der Fluoreszenzemission zu stabilisieren, sollen die Transmembranbausteine **66** und **67** im Folgenden in DMPC-Liposomen eingelagert werden, die zusätzlich mit unterschiedlichen Anteilen DPPC dotiert sind.

3.4.6 Verwendung von DMPC/DPPC-Gemischen als Liposomenmaterial

Durch die Verwendung von Lipidmischungen der beiden im Vorfeld verwendeten Phosphatidylcholine DPPC und DMPC sollte versucht werden, eine optimierte Umgebung für die Signaltransduktion zu schaffen. Über den DMPC-Anteil sollte die Fluidität der Liposomenmembran eingestellt und gewährleistet werden, dass das System sich bei Raumtemperatur in einem flüssigkristallinen Zustand oberhalb der Phasenübergangstemperatur T_C befindet, um eine möglichst große laterale Beweglichkeit der Rezeptoren **66** und **67** in der Membran zu garantieren. Die DPPC-Komponente soll hingegen die optimale Einlagerung der Rezeptoren in die Membran begünstigen, indem sie die freie Drehbarkeit der Fluorophore und Bisphosphonat-Erkennungseinheiten einschränkt und somit eine stabilisierende Wirkung auf das Gesamtsystem ausübt.

Nachdem in einem ersten Experiment mit den Rezeptoren **66** und **67** in einem 50 % DMPC/50 % DPPC-Gemisch erste positive Ergebnisse mit einer leicht gesteigerten Signalübertragung von 19 %, bezogen auf die Abnahme der Tryptophanemission verzeichnet wer-

den konnten, wurde im Folgenden eine Messreihe mit steigen DPPC-Gehalt der Lipidmischung zwischen 10 % und 90 % durchgeführt.

Die Präparation der Liposomen erfolgte nach dem Standardprotoll, die Dotierung beträgt in allen Fällen je 2.5 % und die Messungen wurden wiederum bei 25 C durchgeführt. In Abbildung 137 sind die prozentualen Änderungen der Donor- und Akzepteremission in Abhängigkeit von der verwendeten Lipidmischung dargestellt. Bei allen untersuchten Lipidmischungen konnte im Vergleich zu den reinen Lipiden eine gesteigerte Signalübertragung, induziert durch Zugabe des DET, verzeichnet werden. Die prozentuale botenstoff-induzierte Abnahme der Tryptophanemission des Rezeptors **66** steigt mit zunehmendem DMPC-Anteil in den Lipidmischungen und durchläuft bei einem Mischungsverhältnis von 75 % DMPC/25 % DPPC ein Maximum von 20 %. Ein gleichsinniger Verlauf ist ebenfalls für die prozentuale Zunahme der Dansylemission zu verzeichnen und im Vergleich sogar noch stärker ausgeprägt. Die absoluten Intensitäten der Emissionsmaxima bei 330 nm bzw. 520 nm verhalten sich in analoger Weise (Ergebnisse hier nicht gezeigt).

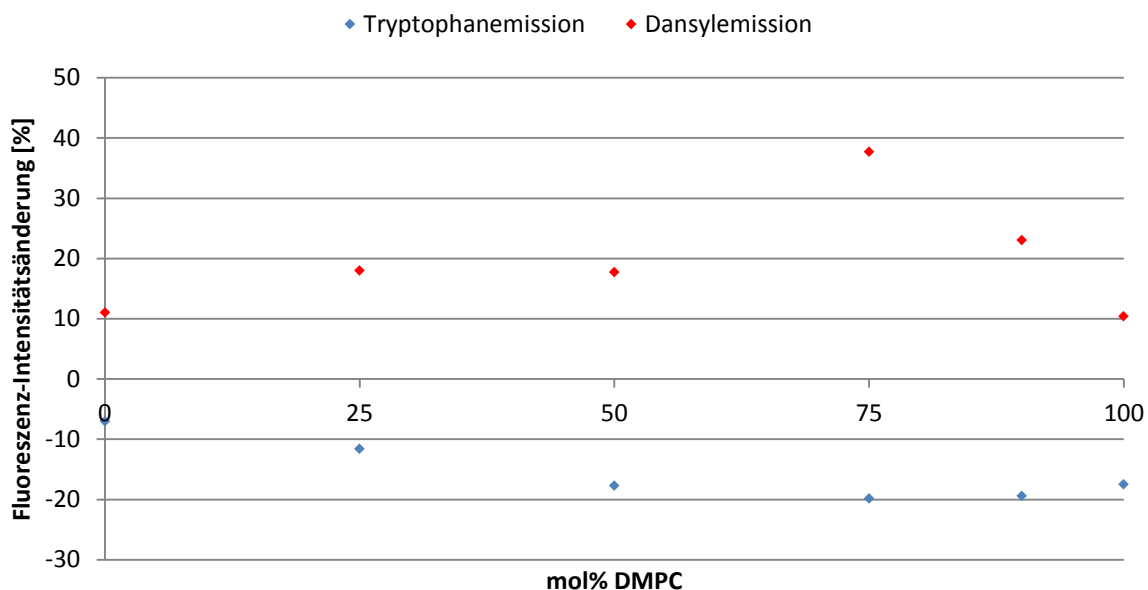


Abbildung 137: Fluoreszenzintensitätsänderung nach Zugabe des Botenstoffs in Abhängigkeit der Lipidmischung.

Die Experimente mit den **66** und **67**-dotierten Liposomen, bestehend aus einer Lipidmatrix mit 75 % DMPC und 25 % DPPC sollen im Folgenden detaillierter betrachtet werden, da in dieser Mischung die größte FRET-Effizienz bezogen auf die prozentuale Abnahme der Donor-Emission nach Zugabe des Botenstoffs detektiert werden konnte. In Abbildung 138 sind die Intensitätswerte der Donor- und Akzeptoremission während der Equilibrierungsphase und nach Zugabe des DET dargestellt. Im Vergleich zu den zuvor vermessenen Liposomen, die nur aus einem Phospholipid bestanden, fällt sofort auf, dass direkt nach der Präparation der Liposomen die maximale Fluoreszenzintensität, sowohl für den Donor,

als auch für den Akzeptor erreicht ist und diese während der gesamten Equilibrierungsphase auf einem sehr konstanten Niveau bleiben. Es ist sogar ein leichter Rückgang des permanenten FRET-Effekts zu beobachten. Nach Zugabe des Botenstoffs kommt es zu einem simultanen Anstieg bzw. Abfall der Donor- und Akzeptor Emission. Der induzierte FRET-Effekt steigt über einen Zeitraum von etwa 10 min an und erreicht nach etwa 20 min ein kon-

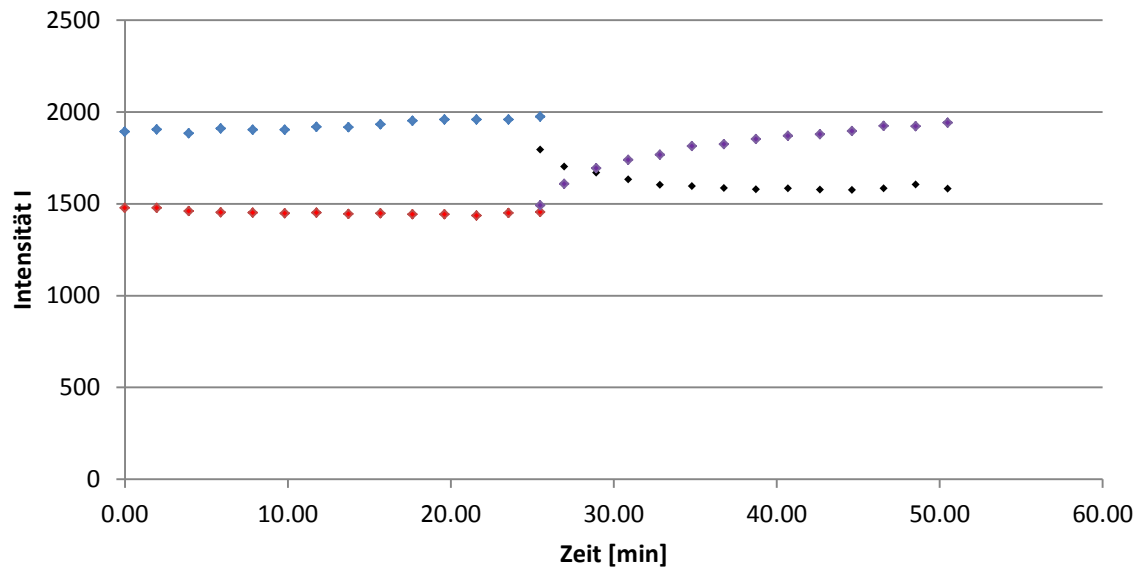


Abbildung 138: blau: 66 (Emission vor Zugabe von 100 eq. DET); schwarz: 66 (Emission nach Zugabe von 100 eq. DET); rot: 67 (Emission vor Zugabe von 100 eq. DET); violett: 67 (Emission nach Zugabe von 100 eq. DET) (5 % in 75 % DMPC – 25 % DPPC).

stantes Maximum. Betrachtet man die Änderung der Fluoreszenzintensitätswerte nach Zugabe von DET, so scheint es, als ob der Ausbildung des ternären Komplexes bzw. der Signaltransduktion eine bestimmte Kinetik Grunde liegt. Des Weiteren kann auch in diesem Sys-

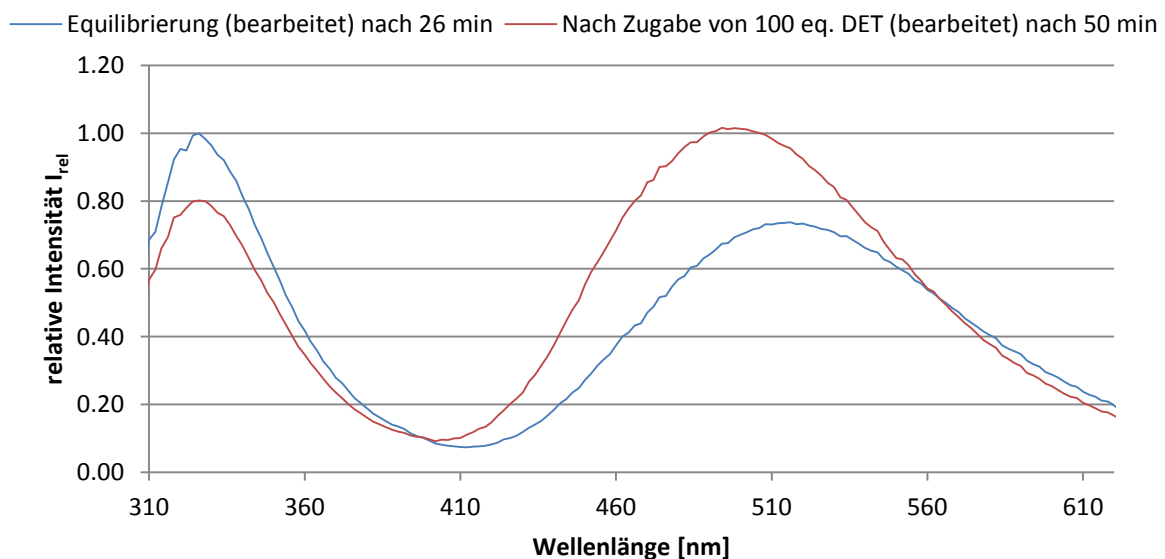


Abbildung 139: Emissionsspektren vor und nach Zugabe von 100 eq. DET (5 % in 75 % DMPC/25 % DPPC).

tem, wie auch in den Systemen mit anderen Lipidmischungsverhältnissen, der bereits bei den Experimenten mit reinen DPPC-Liposomen beobachtete Blau-Shift der Akzeptoremission detektiert werden. Bei der Verwendung der reinen DPPC-Matrix konnte bei dieser Beobachtung über die Ausbildung eines, durch den verringerten Abstand der Rezeptoren **66** und **67** in der Membran induzierten Charge-Transfer-(CT)-Komplexes zwischen aromatischen Systemen der beiden Fluorophore nach Zugabe des Botenstoffs argumentiert werden (Abbildung 140), da eine veränderte Umorientierung in der Membran durch Referenzmessungen mit den einzelnen Rezeptoren ausgeschlossen werden konnte.

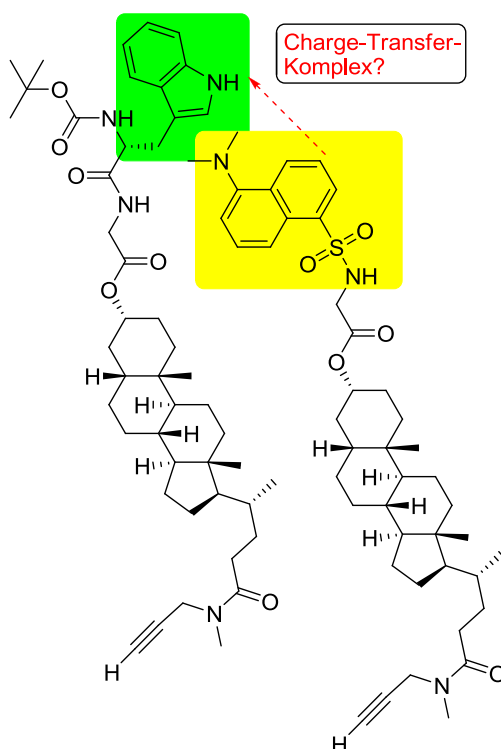


Abbildung 140: Ausbildung eines möglichen CT-Komplexes nach Zugabe des Botenstoffs.

Bei der Verwendung von Lipidmischungen könnten allerdings weitere Effekte für die bathochrome Verschiebung des Dansylemissionsmaximums verantwortlich sein. Diese sollen im Folgenden näher betrachtet werden. In den durchgeführten Messungen konnte das Konzept bestätigt werden, dass der Zusatz von DPPC-Phospholipiden zu einem, mit den Rezeptoren **66** und **67** dotierten DMPC-Liposom, eine stabilisierende Wirkung auf die Einlagerung der Rezeptoren ausübt. Ein Anteil von 10 % bis 25 % DPPC führt zu einem gesteigerten FRET-Effekt im Vergleich zu den reinen Lipiden. Dieser Effekt könnte zum einen im Design des Transmembransegments begründet sein. Die Länge des membrandurchspannenden Segments ist auf die Schichtdicke einer DPPC-Doppelmembran ausgelegt, so dass der Zusatz von DPPC-Lipiden zu einer Art *perfect match* der Rezeptoren **66** und **67** in der veränderten Lipidmatrix führen könnte und so eine räumliche Vororientierung der Rezeptoren **66** und **67**

bedingt (Abbildung 141).^[174] Durch diese Vororientierung befinden sich die Rezeptoren **66** und **67** bereits auf einem geringeren räumlichen Abstand, so dass die chelatartige Erkennung der Botenstoffe DET erleichtert wird und zu der beobachteten gesteigerten Signalleitung führt. Diese Annahme wird durch den Sachverhalt gestützt werden, dass eine statistische

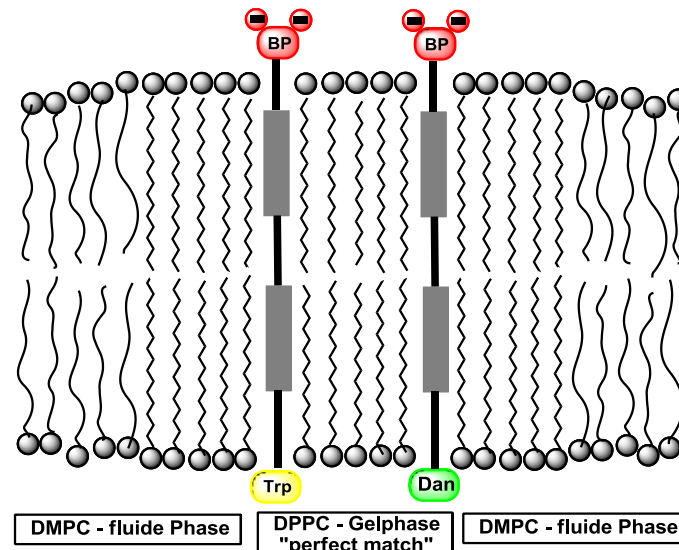


Abbildung 141: DPPC-Match.

Verteilung der DPPC-Moleküle in der DMPC-Umgebung unwahrscheinlich ist. Es könnte zur Ausbildung von DPPC-Domänen innerhalb der DMPC-Umgebung kommen.

In natürlichen Systemen sind sogenannte Lipid-Rafts bekannt, in denen sich Cholesterol (**11**) und verschiedene Lipide jeweils in Mikrodomänen innerhalb einer Zellmembran zusammenlagern.^[231-233] Dieses Phänomen kann auch bei einfachen Modellmembranen beobachtet werden, die nur aus einer Sorte von Lipidmolekülen aufgebaut sind. Besonders im Bereich der Phasenübergangstemperatur liegen die geordnete Phase L0 (*Liquid Ordered Phase*) und die ungeordnete Phase Ld oder La (*Liquid Disordered Phase*) nebeneinander vor (vgl. Kapitel 1.2). Zwischen diesen Phasen ist eine Entmischung beobachtbar, da die Ausbildung der Lipid Rafts zu einer Minimierung der freien Energie zwischen den Phasen führt.^[234]

Da sich die Phasenübergangstemperaturen der verwendeten Lipide mit 21 °C (DMPC) und 41 °C (DPPC) stark unterscheiden, sollte eine Mikrodomänenbildung stark begünstigt sein. Geht man von der Annahme aus, dass die auf Cholesterol-Derivaten aufgebauten Transmembranbausteine sich ähnlich wie natürlich vorkommendes Cholesterol (**11**) verhalten und selbst zur Bildung von Mikrodomänen innerhalb einer Doppelmembran befähigt sind, so würde es sich im vorliegenden System um ein Drei-Komponenten-System handeln, in dem alle beteiligten Spezies bevorzugt Lipid-Rafts ausbilden. Diese Thesen werden durch den starken permanenten FRET-Effekt, der bereits vor Zugabe des Botenstoffs zu beobachten ist, gestützt, da sich im Falle der Ausbildung einer Rezeptor-Domäne oder durch die bevor-

zugte Einlagerung der Rezeptoren in DPPC-Domänen, die Fluorophore sich in direkter Nachbarschaft befinden. Bei der Ausbildung von reinen Rezeptor-Domänen könnte die beobachtete Verschiebung der Dansylemission nach Zugabe des primären Botenstoffs tatsächlich auf die zuvor postulierte Charge-Transfer-Komplexbildung zurückgeführt werden. Diese Aussage ist allerdings nicht haltbar, da Messungen mit deutlich erhöhten Rezeptorkonzentrationen zeigten, dass die Erhöhung der Dotierung zwar zu einer Verstärkung des permanenten Energie-Transfers, aber zu keiner Verschiebung des Dansylemissionsmaximums führt. Durch die konzentrationsabhängige Verringerung des räumlichen Abstands müsste es auch in diesem Experiment zu einer vermehrten Ausbildung von CT-Komplexen kommen (Abbildung 142). Die Verschiebung der Emissionsmaxima umgebungssensitiver Moleküle

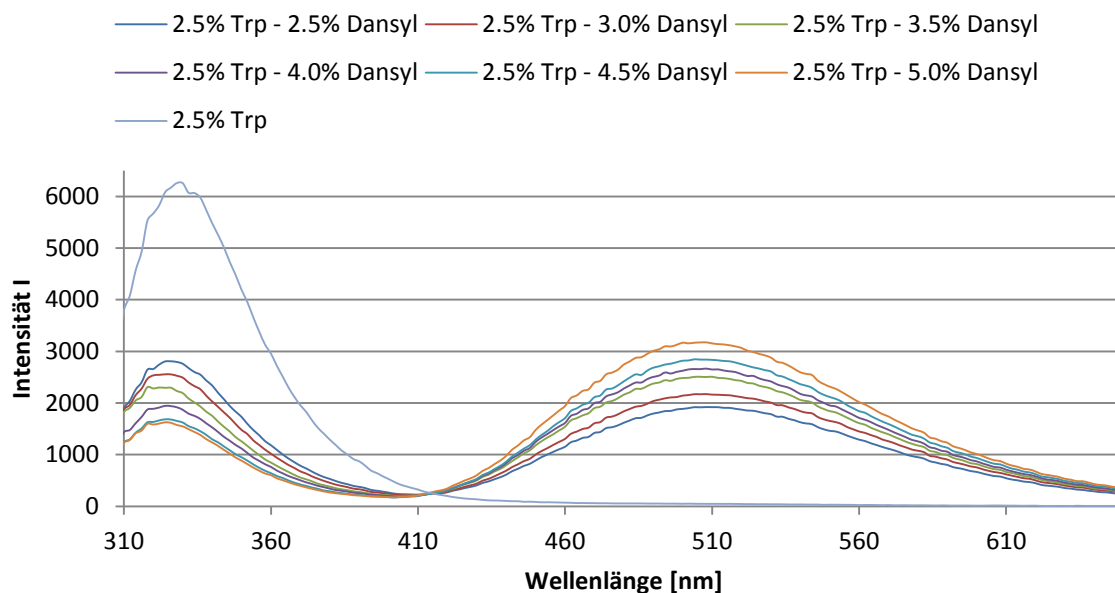


Abbildung 142: Emissionspektren 2.5 % 66 - x % 67-dotierter Liposomen (90 % DMPC - 10 % DPPC) (Equilibrierung).

ist Falle von membrangebundenen Fluorophoren häufig auf eine veränderte Polarität ihrer Umgebung zurückzuführen.^[145,146,235] Die hier auftretende Verschiebung der Akzeptor-Emission zu kleineren Wellenlängen deutet auf den Wechsel der Fluorophore in eine unpolare Umgebung hin.^[235] Für das vorliegende System würde dies bedeuten, dass die Rezeptoren **66** und **67** nach Zugabe des Botenstoffs entweder von einer DMPC-reichen in eine DPPC-reichere Umgebung wandern, oder aus einer DMPC-reichen Umgebung heraus reine Rezeptordomänen bilden. Die DPPC-Moleküle bilden bei der betrachteten Temperatur von 25 °C, die am wenigsten polare Umgebung des Gesamtsystems, da das Eindringen von Wassermolekülen in die Membran durch den Gelzustand weitgehend verhindert wird (vgl. Kapitel 3.4.6.1). Abbildung 143 zeigt schematisch einen, durch laterale Diffusion der Rezeptoren **66** und **76** bedingten, möglichen Wechsel der Lipidumgebung. Dieser denkbare Wechsel könnte ebenfalls für den langsamen Aufbau des botenstoff-induzierten Signals verantwortlich

sein, da zur Ausbildung des ternären Komplexes aus 66/67 und DET erst eine Umorganisation der Membranoberfläche erfolgen muss (Abbildung 138). Der gleiche diffusionskontrollierte Prozess würde auftreten, wenn die Rezeptoren aus einer DMPC-reichen Domäne heraus reine Rezeptordomänen ausbilden.

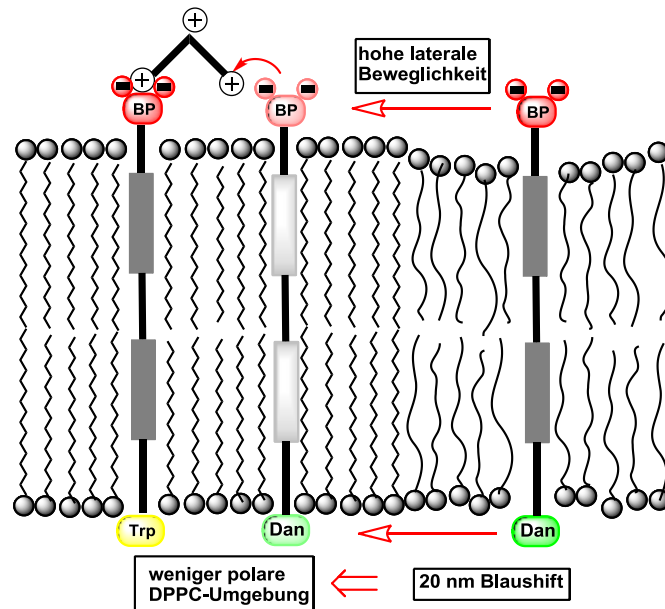


Abbildung 143: Postulierte laterale Diffusion in DPPC-Domäne.

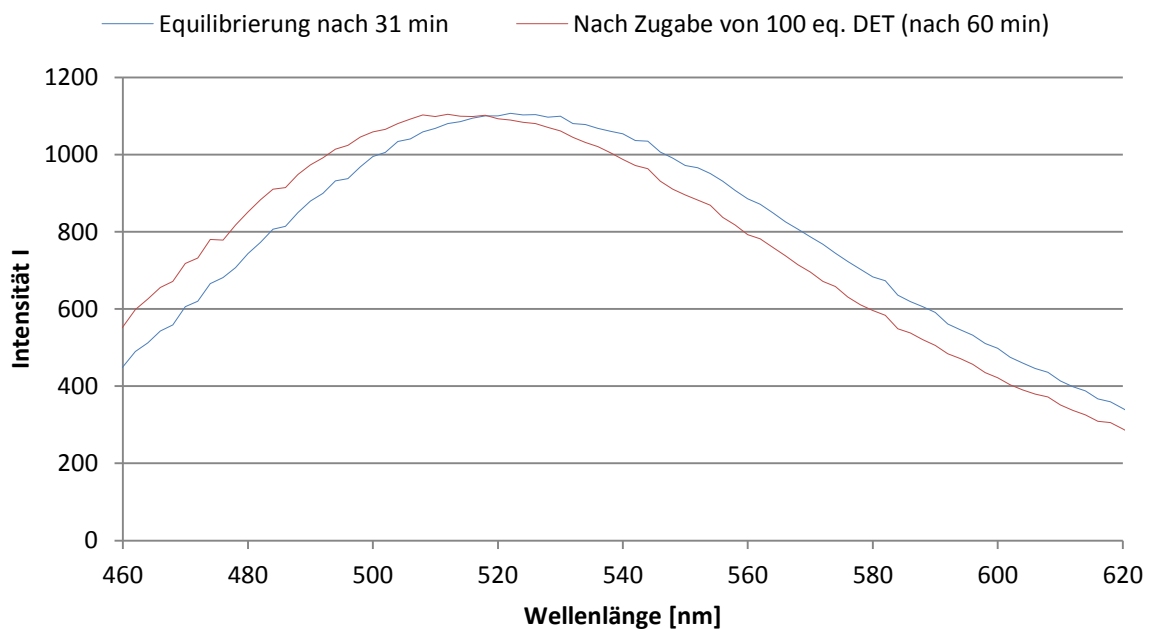


Abbildung 144: Emissionspektren des FRET-Akzeptors 67 vor und nach Zugabe von 100 eq. DET (2.5 % in 75 % DMPC - 25 % DPPC).

Gestützt wird diese Vermutung von zwei weiteren Beobachtungen. Zum einen ist bathochrome Verschiebung umso ausgeprägter, je höher der Anteil an DMPC in der Liposomenmembran ist. Damit verbunden ist eine Erhöhung der Gesamtpolarität bezogen auf die reine

DPPC-Umgebung. Dementsprechend ist die detektierte Veränderung der Polarität beim Wechsel der Lipidumgebung umso größer. Zum anderen tritt die beobachtete Verschiebung des Dansylemissionsmaximums auch bei alleiniger Einlagerung des Rezeptors **67** in ein Liposom, bestehend aus beiden Lipidsorten auf (Abbildung 144). Hier kann durch die Abwesenheit des FRET-Donors **66** kein Energietransfer erfolgen, allerdings kommt es durch Zugabe des Botenstoffs DET aber ebenfalls zu einer Verschiebung des Emissionsmaximums zu kleineren Wellenlängen. Dieser Umstand schließt das Auftreten von CT-Komplexen als mögliche Ursache zusätzlich aus.

Literaturbekannt sind kationeninduzierte Phasenseparationen, bei denen durch Zugabe von Ca^{2+} -Ionen zu, mit langkettigen Phosphorsäuren dotierten, Phosphatidylcholin-Liposomen ein Transfer von Gramicidin von einer Lipidumgebung einer bestimmten Phase, in eine Lipidumgebung eines anderen Phasenzustands erfolgt.^[235] Auch hier konnte eine Blauverschiebung des Emissionsmaximums Dansyl-gelabter Lipide beobachtet werden, ohne dass eine Veränderung der Fluoreszenzintensität auftrat. Durch die Komplexierung der Kationen werden die Phosphorsäure-Derivate chelatisiert und bilden eine eigene Domäne im Gelzustand, innerhalb der Membranoberfläche aus. Da Gramicidin sich bevorzugt in fluide Membranumgebungen einlagert, konnte die Phasenseparation zudem über einen verringerten FRET-Effekt mit den Dansyl-gelabelten Phosphatidylcholinen detektiert und bewiesen werden.^[235]

Dieses Beispiel ist übertragbar auf das vorliegende System, in dem es durch Zugabe eines Polykations ebenfalls zu einer Blauverschiebung der Dansylemission durch Komplexierung von membranbildenden Komponenten kommt.

Zu klären bleibt in diesem Fall, ob die Transmembranbausteine **66** und **67** in DPPC-reiche Domänen wechseln oder selber *Rafts* ausbilden. Diese Fragestellung soll im Rahmen dieser Arbeit nicht beantwortet werden. Aufschluss hierrüber könnten z.B. Experimente liefern, bei denen der Rezeptoren **66** in Lipidmischungen aus beiden Phosphatidylcholinen eingelagert wird, von denen eine Komponente zu einem geringen Anteil selber mit Dansyl-Fluorophoren gelabelt ist. Durch das Auftreten oder Ausbleiben eines Energie-Transfers mit den entsprechenden Lipiden könnte eine Bestimmung der bevorzugten Einlagerung in die Domänen erfolgen. Eine nähere Betrachtung des beobachteten permanenten FRET-Effekts und der damit verbundenen Aussagen, die weitere Hinweise auf die Einlagerung der Rezeptoren **66** und **67** liefern könnten, soll in Kapitel 3.4.10 erfolgen. Im Folgenden sollen die Phasenübergangstemperaturen der verwendeten Lipidmischungen bestimmt werden, um Hinweise über die laterale Beweglichkeit der eingelagerten Transmembranbausteine **66** und **67** zu erhalten und Rückschlüsse auf die Signaltransduktion gezogen werden.

3.4.6.1 Bestimmung der Phasenübergangstemperaturen

Die Bestimmung der Phasenübergangstemperaturen, der im vorigen Kapitel verwendeten Liposomen, bestehend aus unterschiedlichen Mischungsverhältnissen von DMPC und DPPC, erfolgte im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe der Fluoreszenzsonde Laurdan (**24**) (Abbildung 145).

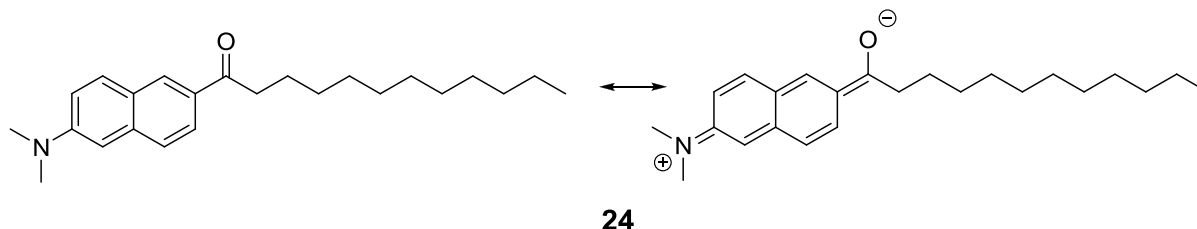


Abbildung 145: Die Fluoreszenz-Sonde Laurdan (**24**).

Da die verwendeten Liposomen keine intrinsische Fluoreszenz aufweisen, muss zur Bestimmung der Phasenübergangstemperaturen eine extrinsische Fluoreszenzsonde, das Laurdan (**24**) zugesetzt werden. Diese ermöglicht die Detektion des Phasenübergangs der Liposomen von der Gelphase in die flüssig-kristalline Phase, da ihr Emissionsmaximum extrem abhängig von der Polarität ihres umgebenden Mediums ist.^[38] Dies resultiert aus einem großen Übergangsdipolmoment im elektronisch angeregten Zustand. Charakteristisch ist ein stark zunehmender Stokes-Shift der Fluoreszenzemission mit steigender Polarität des Lösungsmittels. Die Änderung der Polarität während des Phasenübergangs der Liposomen kann durch das Eindringen von Wassermolekülen in die Lipiddoppelschicht erklärt werden, da hierdurch eine erhöhte Polarität in der Umgebung des Laurdan (**24**) resultiert, welches

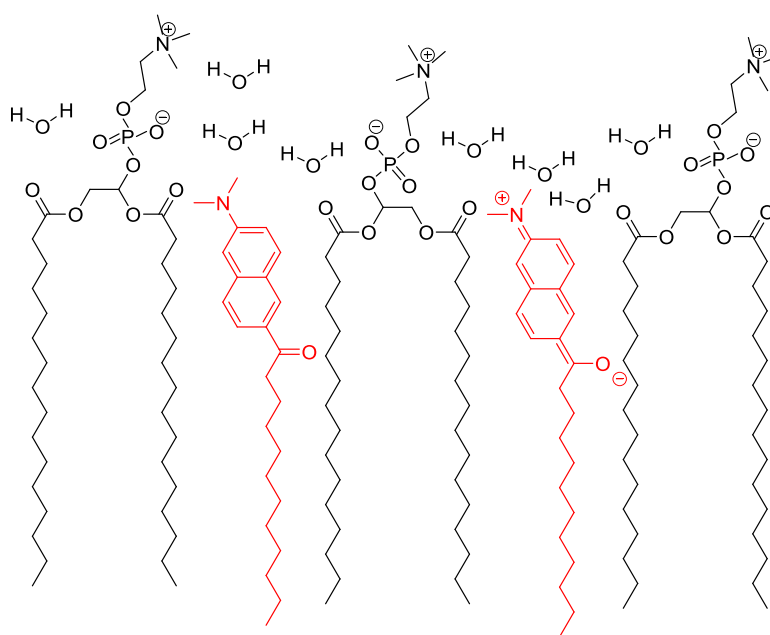


Abbildung 146: Schematische Darstellung des Einbaus von Laurdan (**24**) in eine Phospholipiddoppelschicht.

tief in der Membran verankert ist. Das Emissionsmaximum ändert sich von 440 nm in der Gelphase auf 490 nm in der flüssigkristallinen Phase. Die resultierende Änderung kann durch das Vorliegen, der in Abbildung 145 und 146 abgebildeten Resonanzstrukturen beschrieben werden.^[38] Zu den charakteristischsten spektroskopischen Eigenschaften von Laurdan (**24**) zählen die Unabhängigkeit von der Kopfgruppe des verwendeten Phosphatylcholins und die Unabhängigkeit des Intensitätsverhältnisses an den Emissionsmaxima von der Konzentration von Laurdan (**24**) in der Membran.^[38] Zur quantitativen Beschreibung der Phasenkoexistenz und der Übergänge in den betrachteten Membranen wurde das Konzept der „verallgemeinerten Polarisation“ (*generalized Polarisation, GP*) entwickelt:^[38]

$$GP = \frac{I_B - I_R}{I_B + I_R} \quad (10)$$

I_B und I_R sind die Intensitäten der Fluoreszenzemission im blauen und im roten Bereich des Spektrums. Somit entspricht I_B der Wellenlänge 440 nm und I_R der Wellenlänge 490 nm. Durch Auftragung des GP-Wertes gegen die Temperatur T [°C] kann die Phasenübergangstemperatur T_C durch einen sigmoidalen Fit als Wendepunkt der Funktion ermittelt werden. Dieser dimensionslose Wert erlaubt eine Beurteilung des Membranzustandes bezüglich der Polarität. Somit können die Zustände unterschiedlicher Membranen im Hinblick auf Polarität und Fluidität bei einer gegebenen Temperatur T verglichen werden.^[38]

Die Einlagerung von Gastmolekülen in eine Membran hat, wie in natürlichen Membranen z.B. das Cholesterol (**11**), einen direkten Einfluss auf die Phasenübergangstemperatur T_C . Um den Einfluss der Fluoreszenzsonde Laurdan (**24**) auf das Phasenverhalten der präparierten Liposomen möglichst gering zu halten, wurden die untersuchten Liposomen, hergestellt aus unterschiedlichen Mischungsverhältnissen an DMPC und DPPC, mit einem Anteil von 1 % Laurdan (**24**) dotiert. Dies entspricht einer Konzentration von 10^{-5} mol/L und lässt eine sensitive Bestimmung der Emissionsmaxima zu. Die Präparation der Liposomen erfolgte nach dem in Kapitel 3.3.3.2 beschriebenen Standardverfahren. Um die Änderung der Phasenzustände möglichst detailliert erfassen zu können, wurden die Messungen über einen großen Temperaturbereich durchgeführt und die Temperatur in Schritten von 2 °C erhöht. Nach jeder Temperaturerhöhung wurde das System für 10 min bei der jeweiligen Temperatur inkubiert. Um zu überprüfen, ob die experimentellen Rahmenbedingungen für die folgenden Messungen geeignet sind, wurden als erstes die Phasenübergangstemperaturen T_C der Liposomen aus den reinen Lipiden DMPC bzw. DPPC bestimmt, da die Überprüfung der Ergebnisse über den Vergleich mit Literaturdaten erfolgen kann. ^[18,24,37,236] Abbildung 147 zeigt exemplarisch die temperaturabhängigen Fluoreszenzspektren der Sonde Laurdan (**24**),

eingelagert in DMPC-Liposomen. Die Phasenübergangstemperatur T_c , die mit $24.6\text{ }^\circ\text{C}$ für die reine DMPC-Matrix bestimmt werden konnte, stimmt gut mit den Literaturwerten überein ($23\text{ }^\circ\text{C}$).^[38] Für reine DPPC-Liposomen konnte eine Umwandlungstemperatur von $39.5\text{ }^\circ\text{C}$ ermittelt werden, die ebenfalls mit den Literaturdaten eine gute Übereinstimmung aufweist ($41\text{ }^\circ\text{C}$).^[38] In analoger Weise wurden die Phasenübergangstemperaturen T_c für die verwendeten Lipidmischungen ermittelt.

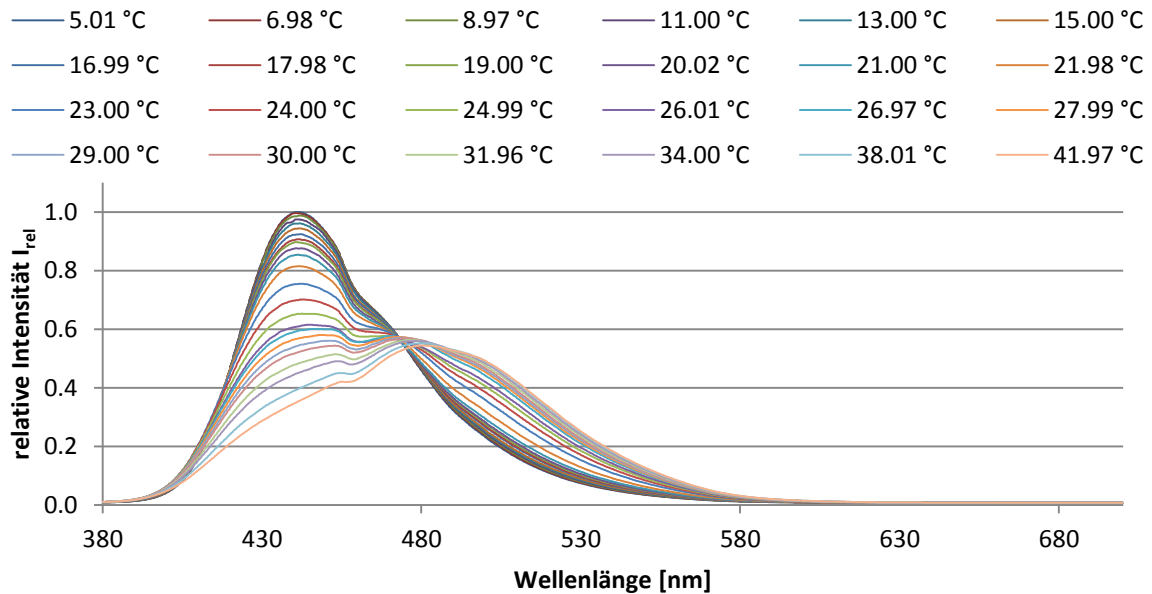


Abbildung 147: Temperaturabhängige Emissionsspektren von 1 % Laurdan (24) in 100 % DMPC.

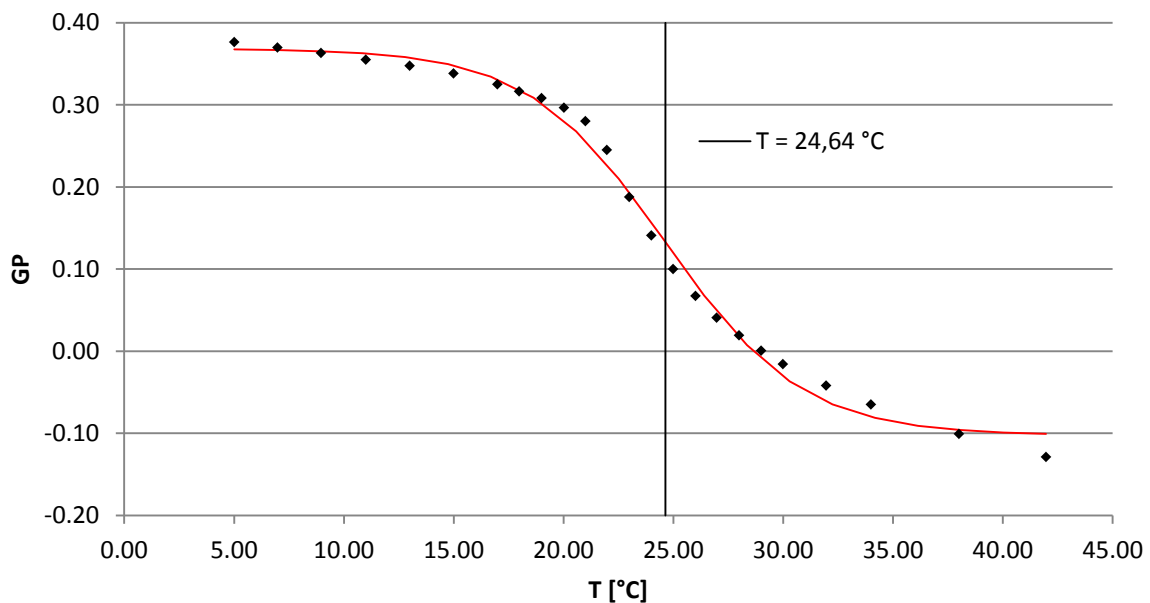


Abbildung 148: GP-Werte von 1 % Laurdan (24) in 100 % DMPC als Funktion der Temperatur.

In Abbildungen 149 sind die Polarisationskurven für die unterschiedlichen Mischungen dargestellt. Die erhaltenen charakteristischen Werte für jedes System sind in Tabelle 2 gegenübergestellt.

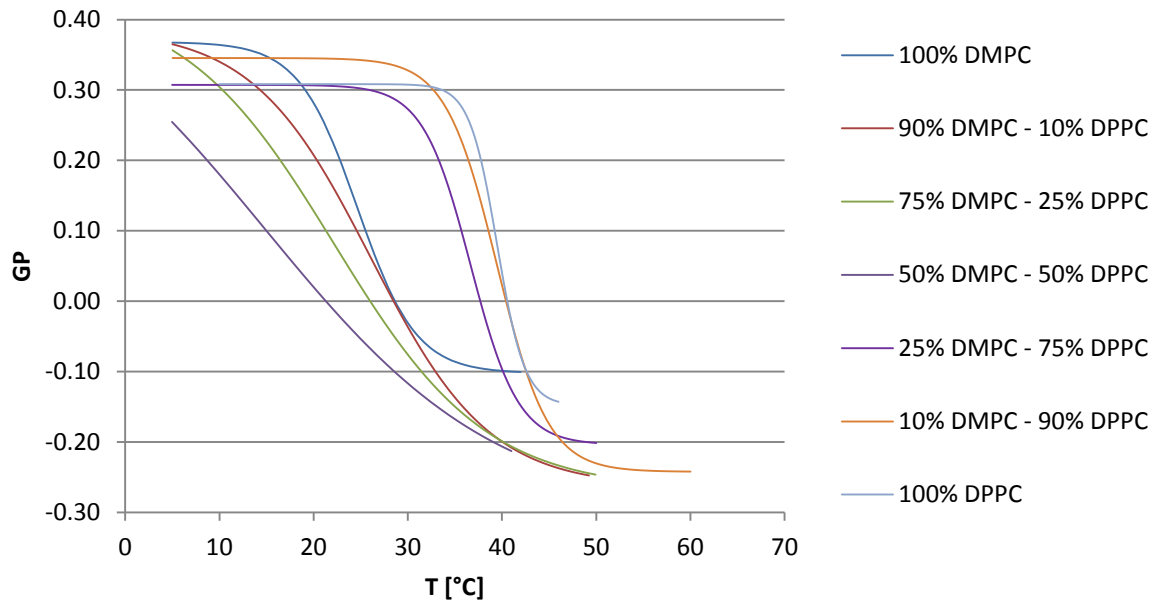


Abbildung 149: Vergleich des Phasenverhaltens der unterschiedlichen Phospholipidmischungen (GP vs. T).

Tabelle 2: Vergleich der charakteristischen Werte für die unterschiedlichen Phospholipidmischungen.

DMPC [%]	100	90	75	50	25	10	0
DPPC [%]	0	10	25	50	75	90	100
T_c [°C]	24.64	26.06	22.16	23.75	36.65	39.65	39.48
GP-Wert (Gelphase)	0.38	0.36	0.35	0.25	0.32	0.35	0.32
GP-Wert (fluide Phase)	-0.21	-0.26	-0.27	-0.22	-0.22	-0.28	-0.15
Phasenkoexistenzgebiet [°C]	13-34	10-45	10-47	5-40	30-45	32-50	35-42

Bei der Auswertung der Ergebnisse können einige interessante Beobachtungen gemacht werden. Als erstes fällt auf, dass den Liposomen aus den reinen Lipiden und solche mit einem geringen DMPC-Anteil eindeutige GP-Werte für die Gel- und die fluide Phase zugeordnet werden können. Die Mischungen ab einem DMPC-Anteil von 50 % weisen hingegen einen breiten Phasenkoexistenzbereich auf, der aus dem Temperaturbereich zwischen den beiden Asymptoten, die die reinen Phasen beschreiben, ermittelt werden kann. Für die 1:1-Mischung der beiden Lipide kann kein GP-Wert bestimmt werden, der den reinen Phasen zuzuordnen ist. In diesem Fall scheint eine stetige Umwandlung der Membran stattzufinden. Betrachtet man die eigentlichen Phasenumwandlungstemperaturen T_c , so zeigt sich, dass diese bei sich konstant ändernden Mischungsverhältnissen des Lipidmaterials, bei einem Anteil von 75 % DMPC und 25 % DPPC eine Art Eutektikum erreicht ist. Für diese Mischung konnte mit ca. 22 °C die niedrigste Umwandlungstemperatur ermittelt werden. Die Dotierung der jeweils reinen Membranen mit einem Anteil von jeweils 10 % des anderen

Lipidmaterials hat nur einen sehr geringen Einfluss auf die Änderung der Phasenumwandlungstemperatur T_c ($0 - 2\text{ }^\circ\text{C}$). D.h., dass die mögliche Ausbildung von kleinen Mikrodomänen eines Lipids in dem jeweils anderen, keinen großen Einfluss auf die Fluidität der gesamten Membran ausübt. Eine signifikante Erniedrigung der Umwandlungstemperatur ist bei der Erhöhung des DMPC-Anteils von 25 % auf 50 % zu verzeichnen. Für die 1:1-Mischung liegt die Phasenübergangstemperatur $13\text{ }^\circ\text{C}$ unterhalb der des 3:1-Gemischs aus DPPC : DMPC und besitzt das bereits angeführte breite Phasenkoexistenzgebiet. Hier lässt sich vermuten, dass Entmischungsphänomene zwischen den beiden unterschiedlichen Lipiden für dieses ständige Aufschmelzen der Membran verantwortlich sind. Aus diesem Grunde sollten die ermittelten Phasenübergangstemperaturen T_c für die verschiedenen Lipidmischungen mit Vorsicht betrachtet werden. Die, aus dem sigmoidalen Fit der Auftragung GP gegen die Temperatur T , ermittelten Umwandlungstemperaturen setzen sich möglicherweise aus den Umwandlungstemperaturen der beiden einzelnen Lipide zusammen. Bei einer strikten Domänentrennung, bzw. Umorganisation müssten im Idealfall zwei Wendepunkte der aufgetragenen Funktionen zu ermitteln sein. Überlagern sich diese stark, so ist, wie Fall der 1:1-Mischung kein Wendepunkt der Funktion mehr zu detektieren. Das Aufzeigen von Mischungs- bzw. Entmischungsvorgängen zwischen den Lipiden sind mit dieser Methode allerdings nicht möglich.

Setzt man die Ergebnisse der Signaltransduktionsexperimente aus Kapitel 3.4.6 in Bezug zu den ermittelten Phasenübergangstemperaturen T_c , so zeigt sich, dass tatsächlich ein direkter Zusammenhang zwischen der botenstoff-induzierten Signalleitung über die Doppelmembran hinweg und der Fluidität der entsprechenden Liposomendoppelmembran besteht. Für das System **66/67** in Liposomen aus 75 % DMPC und 25 % DPPC konnte das größtmögliche zu induzierende Signal, sowohl für die Tryptophan-Donor-Emission **66** (-20 %) als auch für die Dansyl-Akzeptor-Emission **67** (38 %) detektiert werden. Diese Mischung besitzt mit ca. $22\text{ }^\circ\text{C}$ die niedrigste Phasenumwandlungstemperatur und weist somit bei einer Temperatur von $25\text{ }^\circ\text{C}$, bei der die Signaltransduktionsexperimente durchgeführt wurden, die beweglichste Membran auf (Abbildung 150). Hiermit sollte ebenfalls, die größtmögliche laterale Beweglichkeit der Rezeptoren **66** und **67** innerhalb der Membran verbunden sein und zu den besten Voraussetzungen für die schnelle Bildung des ternären Komplexes aus dem Botenstoff DET und den beiden Rezeptoren **66** und **67** führen. Weitere Aussagen über das zusätzliche Auftreten einer Mikrodomänenbildung oder von Lipid-Rafts, sowie das Vorliegen eines eventuellen *perfect match* der Rezeptoren **66** und **67** in der DPPC-Umgebung, die in Kapitel 3.4.6 getroffen wurden, können mit Hilfe der verwendeten Methode nicht überprüft werden. Auch der Umstand, dass bei Verwendung der reinen Lipide

annähernd identische Ergebnisse im Bezug auf die Signaltransduktion erhalten werden konnten, obwohl die Phasenübergangstemperatur T_c für DMPC bzw. DPPC sich mit 24 °C und 40 °C deutlich unterscheiden, kann nicht hinreichend erklärt werden.

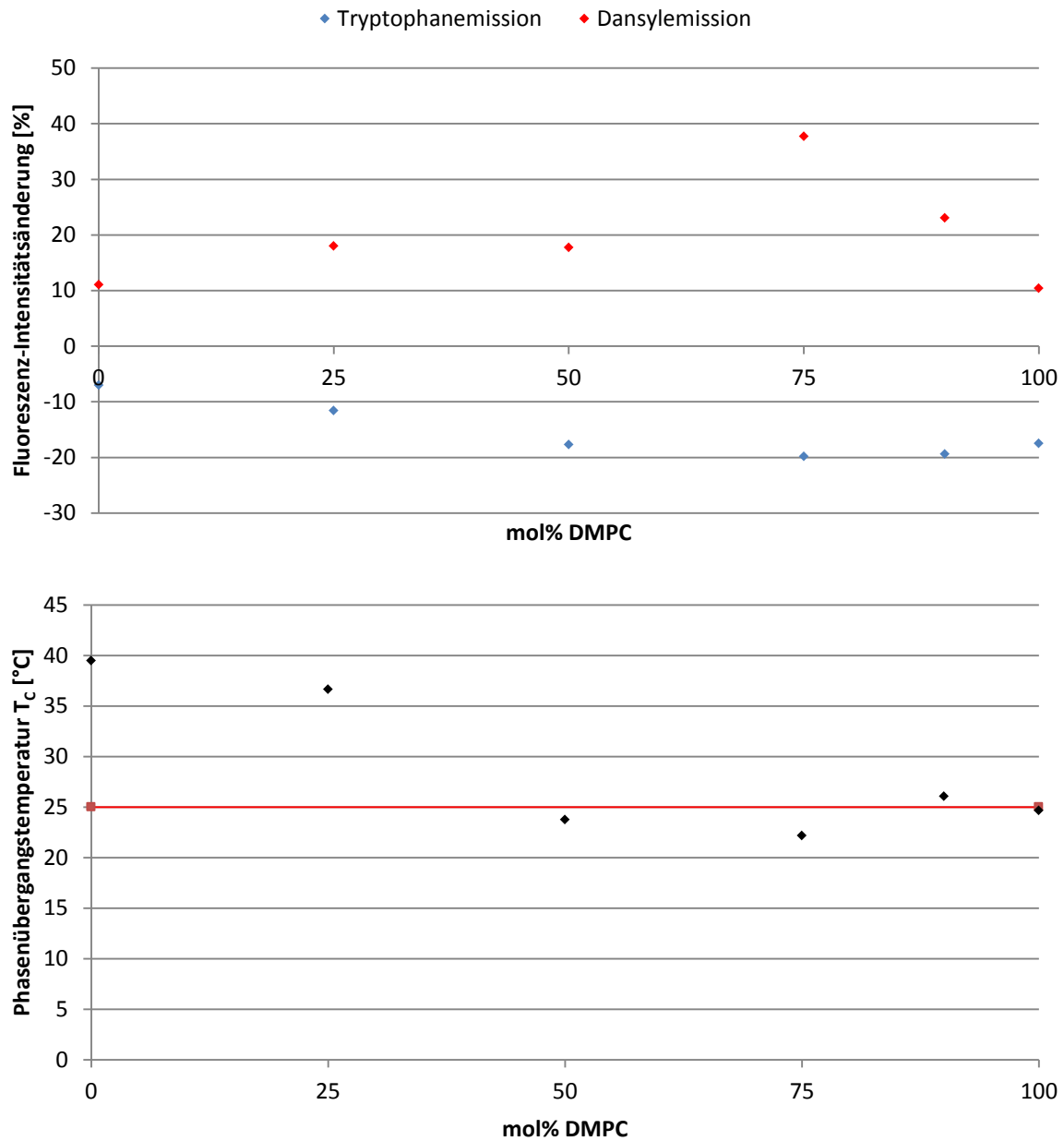


Abbildung 150: Fluoreszenzintensitätsänderung in Abhängigkeit der Phasenübergangstemperaturen.

3.4.6.2 Bestimmung der Phasenübergangstemperaturen dotierter DMPC/DPPC-Liposomen

Um noch detailliertere Information über die betrachteten Systeme erhalten zu können und den Einfluss der in die Membran eingelagerten Transmembranrezeptoren auf das Phasenverhalten der untersuchten Liposomen zu beurteilen, sollte die Bestimmung der Phasenübergangstemperatur T_C nun in Gegenwart von Transmembran-Einheiten durchgeführt werden. Da die Rezeptoren **66** und **67** eine intrinsische Fluoreszenz besitzen, kommen sie für die Untersuchung mittels der Fluoreszenzsonde Laurdan (**24**) nicht in Frage, da eine korrekte Detektion der entscheidenden Emissionsmaxima bei 440 nm und 490 nm nicht mehr gewährleistet ist.

Zu diesem Zweck sollten verschiedene Modellrezeptoren synthetisiert werden, die zum einen mit unterschiedlichen Kopfgruppen funktionalisiert sind und zum anderen entweder ein membrandurchspannendes Zentalsegment besitzen oder nur das Lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Grundgerüst (**71**) tragen. So sollte es möglich sein, sowohl Aussagen über den Einfluss einer starren Zentralregion, als über den Einfluss unterschiedlicher Kopfgruppen auf das Phasenverhalten der Liposomen treffen zu können. In den bereits durchgeführten Experimenten hatte sich gezeigt, dass Liposomen, bestehend aus einer Lipidmatrix mit 75 % DMPC und 25 % DPPC, die besten Ergebnisse im Bezug auf die Signaltransduktion mit den Rezeptoren **66** und **67** lieferten. Zudem besitzt diese Lipidmischung mit 22 °C die niedrigste Phasenübergangstemperatur aller untersuchten Mischungen. Nun bleibt zu zeigen, ob durch die Dotierung mit Transmembranrezeptoren **66** und **67** weiterhin eine Phasenübergangstemperatur unterhalb von 25 °C gewährleistet ist und somit eine hohe Mobilität in der Membran ermöglicht.

Als Kopfgruppen für die monomeren und dimeren Lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Derivate sollen die Bisphosphonat-Erkennungseinheit, eine Ammonium-Kopfgruppe, eine Arginin-Kopfgruppe, eine mit einem Glycin-Linker verlängerte Arginin-Kopfgruppe, sowie die unfunktionalisierte Hydroxyfunktion des Lithocholsäure-*N*-methylpropargylamids (**71**) zu Einsatz kommen, um eine große Bandbreite an möglichen einflussreichen Faktoren abzudecken und beurteilen zu können. Die monomeren Bausteine **75** und **73** mit Bisphosphonat- bzw. Ammonium-Kopfgruppe und der unfunktionalisierte Gerüstbaustein **71** sind bereits aus den Synthesen der Rezeptoren **66** und **67** vorhanden.

3.4.6.2.1 Synthese der Transmembranbausteine 88 und 90

Die Synthese des dimeren Diammonium-Transmembranbausteins **88** erfolgte ausgehend vom bereits synthetisierten Lithocholsäure-Derivat **72**. Die Kupfer-vermittelt Glaser-Kupplung lieferte das zweifach Boc-geschützte Derivat **87** in sehr hohen Ausbeuten und über die anschließende Entschützung unter sauren Bedingungen konnte das Diammonium-

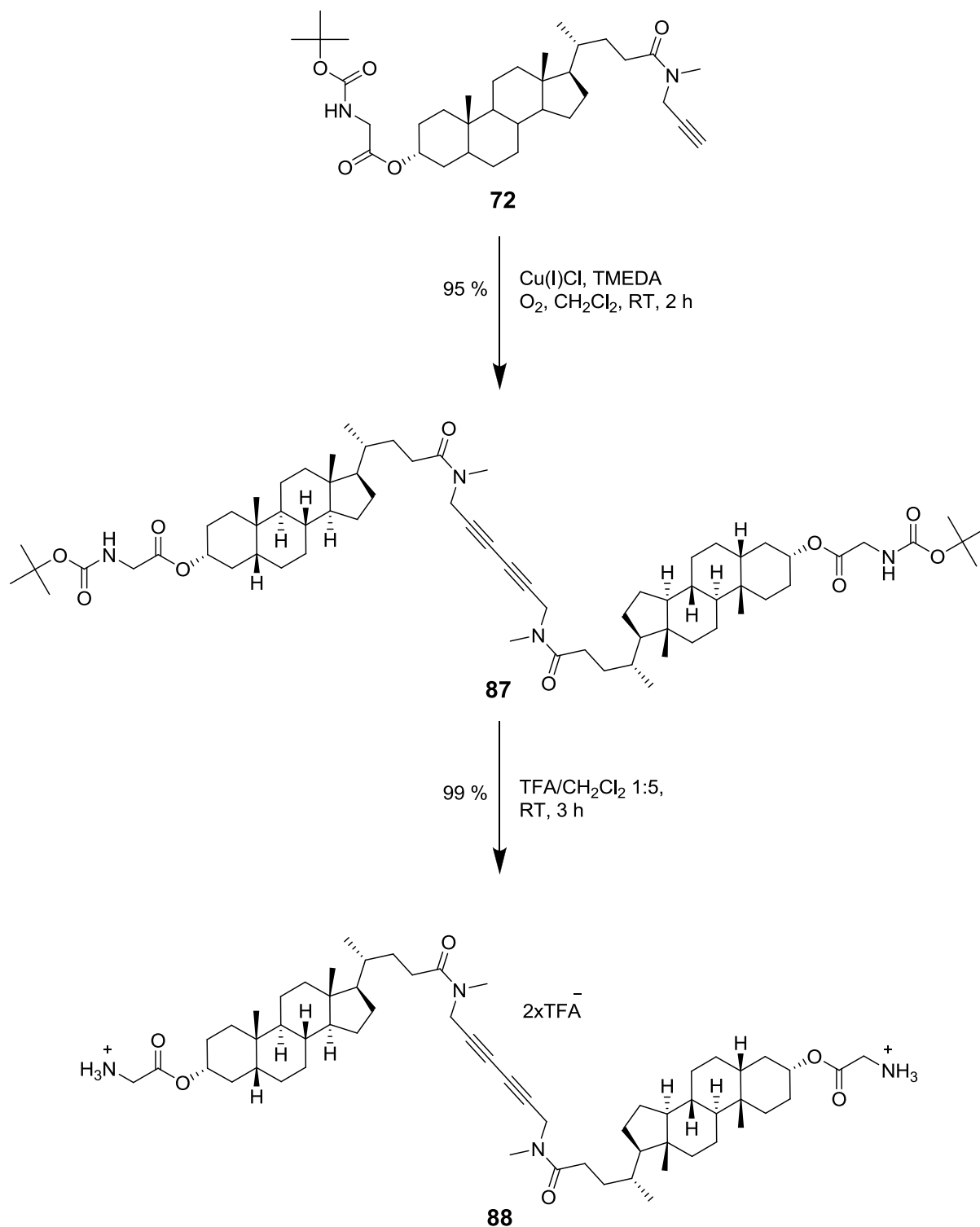


Abbildung 151: Synthese des Diammonium-Lithocholsäure-Dimers **88**.

Lithocholsäure-Dimer **88** mit quantitativem Umsatz erhalten werden. Die Dimerisierung des Bausteins **75** erfolgte wiederum über eine Glaser-Kupplung. Über die anschließende LiBr-Spaltung der Verbindung **89** wurde der dimere Bisphosphonatrezeptor **90** mit quantitativem Umsatz erhalten.

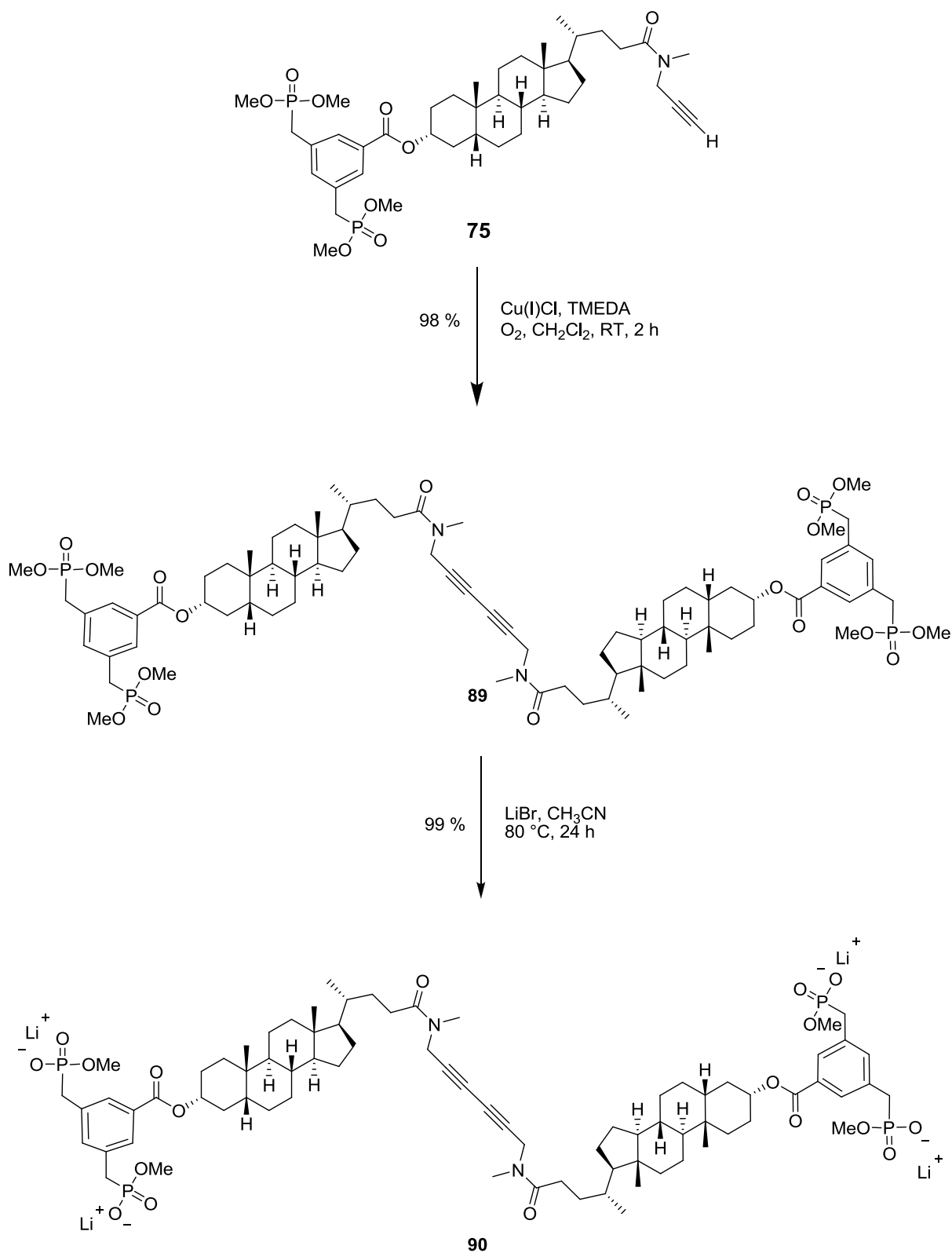


Abbildung 152: Synthese des Lithocholsäure-Dimers **90** mit zwei Bisphosphonatpinzetten.

3.4.6.2 Synthese der Membranbausteine 93, 94, 97, 99 mit Arginin-Kopfgruppe

Für die Funktionalisierung mit Arginin-Kopfgruppen wurden die Gerüstbausteine **71** und **73** mit kommerziell verfügbarem *N*-Boc-Arginin(Boc)₂-OH HCTU-vermittelt zu den Zwischenstufen **91** und **92** gekuppelt. Die Anknüpfung an den Glycin-Linker von **73** lieferte akzeptable Ausbeuten. Die Peptidkupplung mit der sekundären Alkoholfunktion der Verbindung **71** erbrachte hingegen nur geringe Umsätze. Auch durch die Verwendung von alternativen Kupplungsreagenzien wie DCC, DIC und dem Mukayama-Reagenz konnte die Ausbeute nicht gesteigert werden. Möglicherweise ist die schlechte Reaktivität zum einen

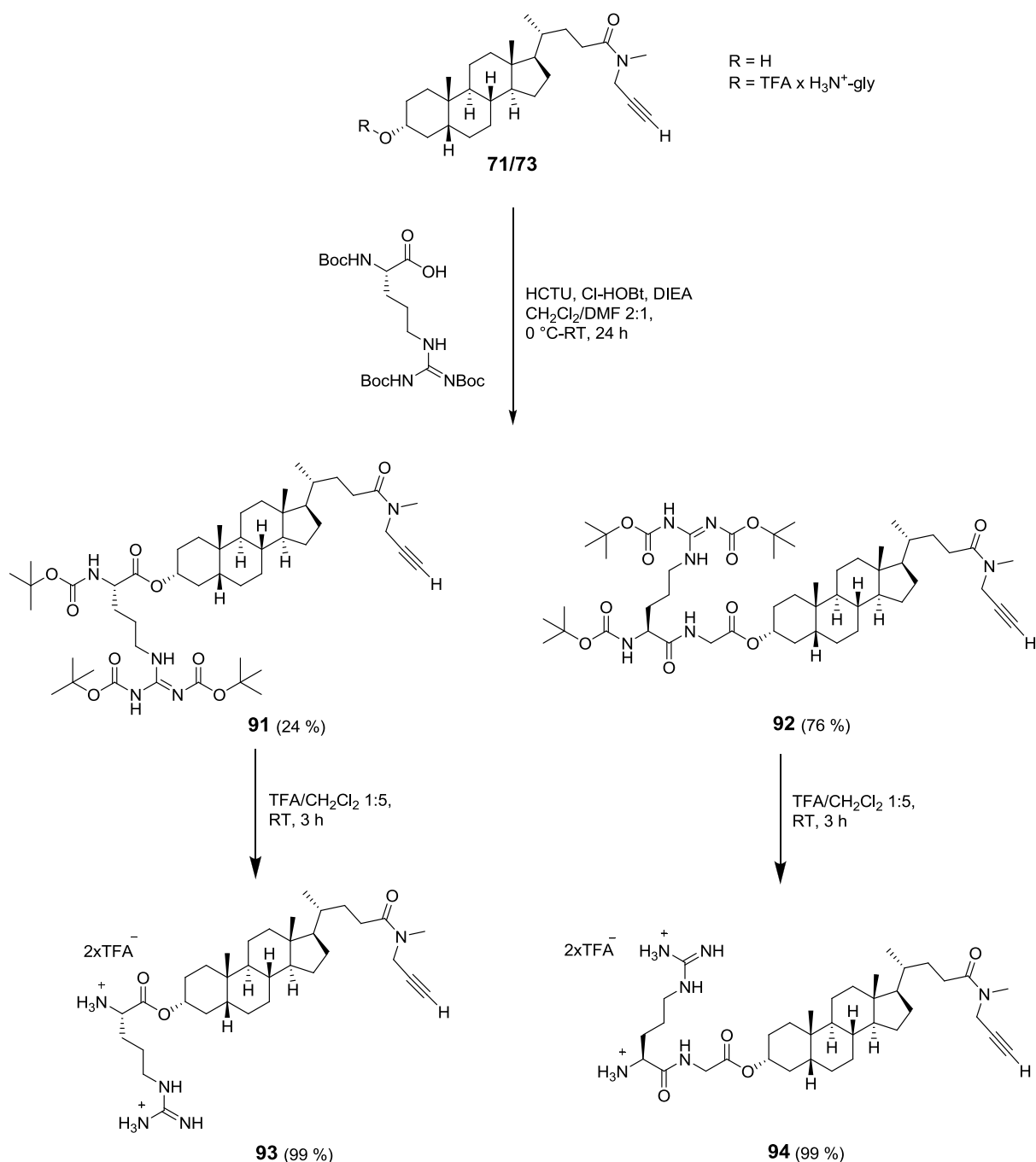


Abbildung 153: Synthese der Bausteine **93** und **94** mit Arginin-Kopfgruppe.

durch den sterischen Anspruch der *N*-Boc-geschützten Arginin-Seitenkette und zum anderen durch die im Vergleich zum primären Amin herabgesetzte Reaktivität des sekundären Alkohols bedingt. An den Zwischenstufen **91** und **92** wurden abschließend die drei Boc-Schutzgruppen unter Verwendung von TFA entfernt. Die Synthese der dimeren Arginin-Derivate **97** und **99** erfolgte nach dem gleichen Syntheseprotokoll, welches bei den monomeren Bausteinen **91** und **92** eingesetzt wurde. Das als Nebenprodukt der Synthese 5.3.6.4 isolierte Lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer **95** wurde mit *N*-Boc-Arginin(Boc)₂-OH zur Zwischenstufe **96** umgesetzt und anschließend die Boc-Schutzgruppen mit TFA entfernt.

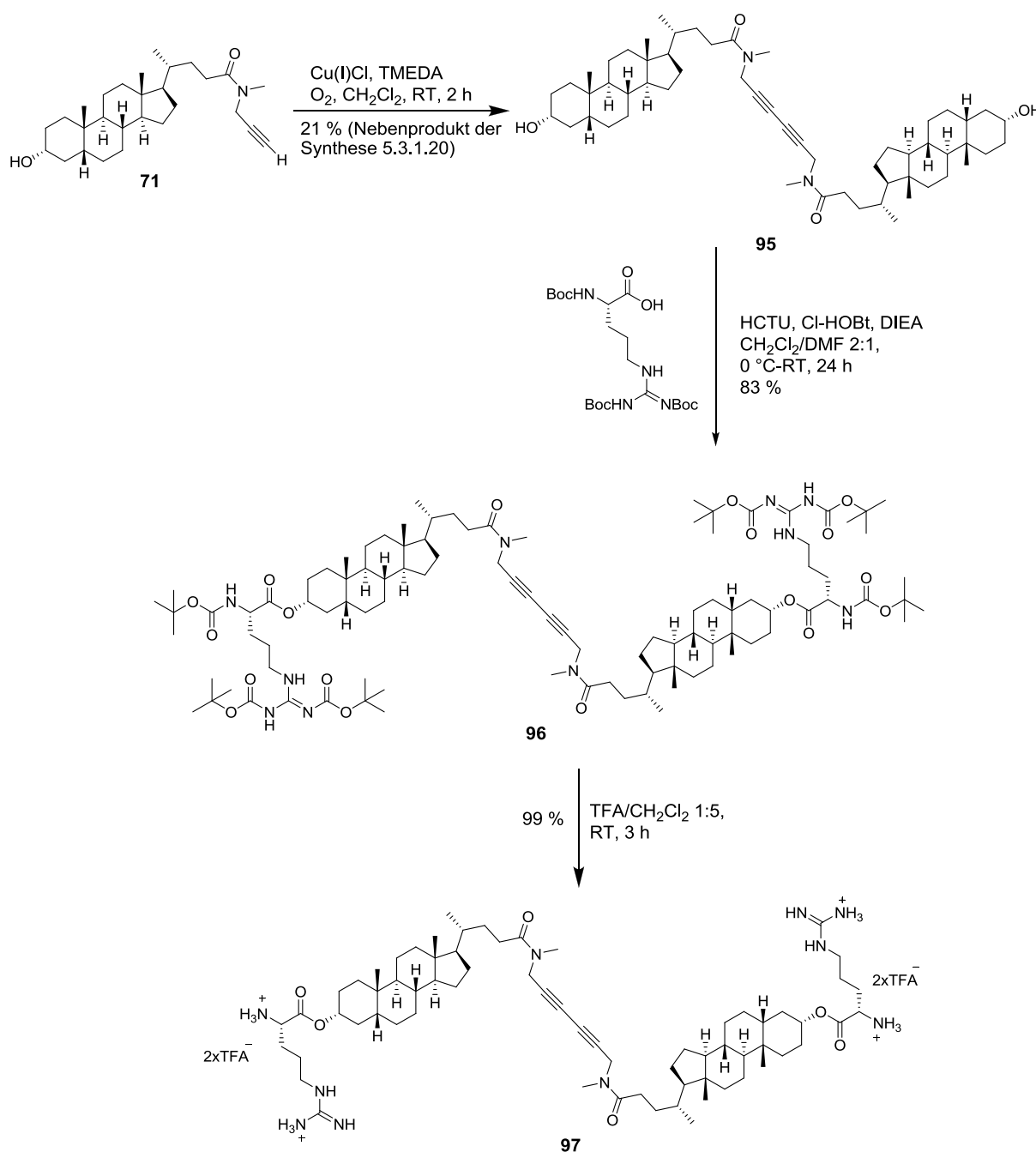


Abbildung 154: Synthese des Transmembranbausteins **97** mit Arginin-Kopfgruppe.

Die Ausbeute an **97** war ebenfalls sehr gering, wurde aber in auch in diesem Fall gebilligt, da nur geringe Mengen der Transmembranbausteine für die anstehenden Messungen benötigt wurden. Für die Anknüpfung der Arginin-Kopfgruppe über den Glycin-Linker, wurde der bereits hergestellte Transmembranbaustein **88** verwendet. Nach der beschriebenen Reaktionssequenz konnte die Zielverbindung **99** in guten Ausbeuten erhalten werden.

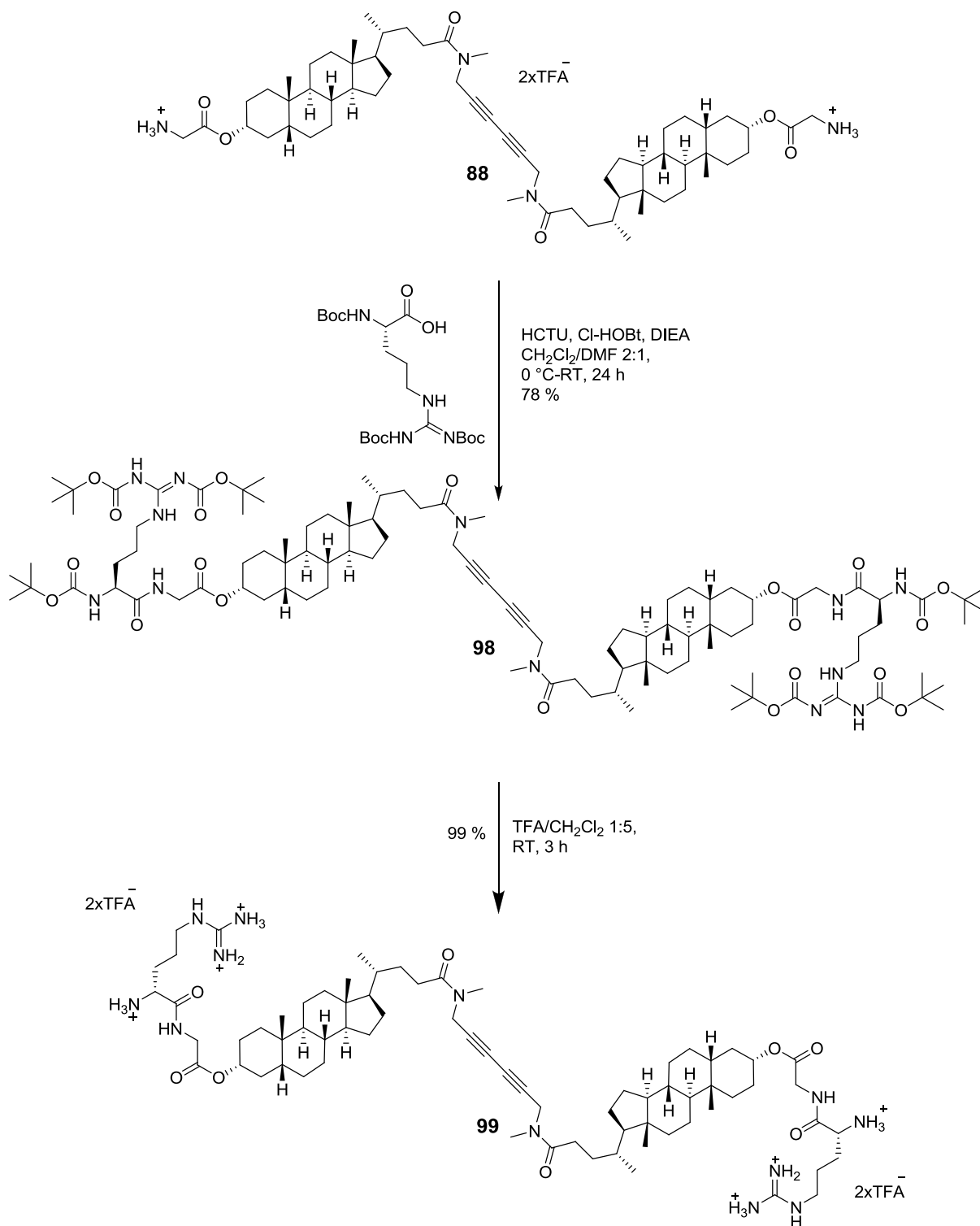


Abbildung 155: Synthese des Transmembranbausteins **99** mit Arginin-Kopfgruppe und Glycin-Spacer.

3.4.6.2.3 Einlagerung monomerer Lithocholsäurederivate

Die synthetisierten monomeren Lithocholsäure-Derivate **71**, **73**, **76**, **93** und **94** wurden in Gegenwart von 1 % Laurdan (**24**) analog der Vorschrift 3.4.6.1 mit einem Anteil von 10 % in die Liposomen, bestehend aus 75 % DMPC und 25 % DPPC eingelagert (Abbildung 156). Die temperaturabhängigen Fluoreszenzmessungen wurden ebenfalls entsprechend der Vorschrift 3.4.6.1 durchgeführt. Um später einen direkten Vergleich zwischen dem Einfluss der unterschiedlichen Kopfgruppen und dem Einfluss eines starren Zentralsegments herstellen zu können, wurde eine Dotierung von 10 % gewählt. Die dimeren Lithocholsäure-Derivate **88**, **90**, **95**, **97** und **99** sollen in den anstehenden Messungen, analog zu den

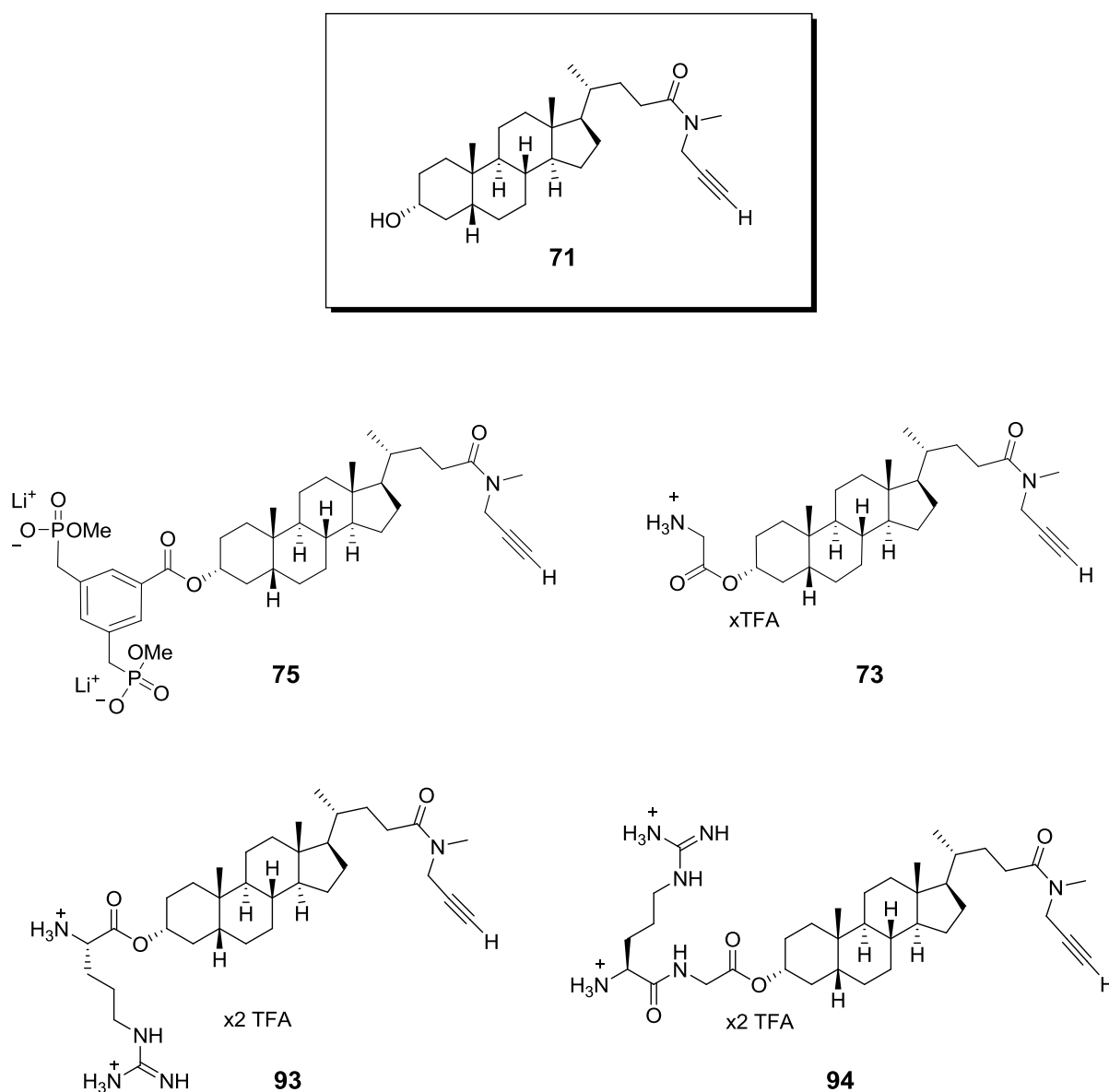


Abbildung 156: Einlagerung monomerer Lithocholsäurederivate.

mit den Rezeptoren **66** und **67**, mit einer Dotierung von 5 % in die Membran eingelagert werden. Somit steht für den Vergleich der monomeren- und dimeren Lithocholsäure-

Derivate Signaltransduktionsexperimenten eine konstante Anzahl an Kopfgruppen zur Verfügung und sollte differenzierte Aussagen über den Einfluss der starren Zentralregion der dimeren Derivate **88**, **90**, **95**, **97** und **99** zulassen. Im Folgenden soll zuerst der Einfluss unterschiedlicher Kopfgruppen, der eingelagerten Bausteine **71**, **73**, **75**, **93** und **94** diskutiert werden. In Abbildungen 157 sind die Polarisationskurven für die unterschiedlichen eingelagerten Derivate dargestellt. Die erhaltenen charakteristischen Werte für jedes System sind in Tabelle 3 gegenübergestellt.

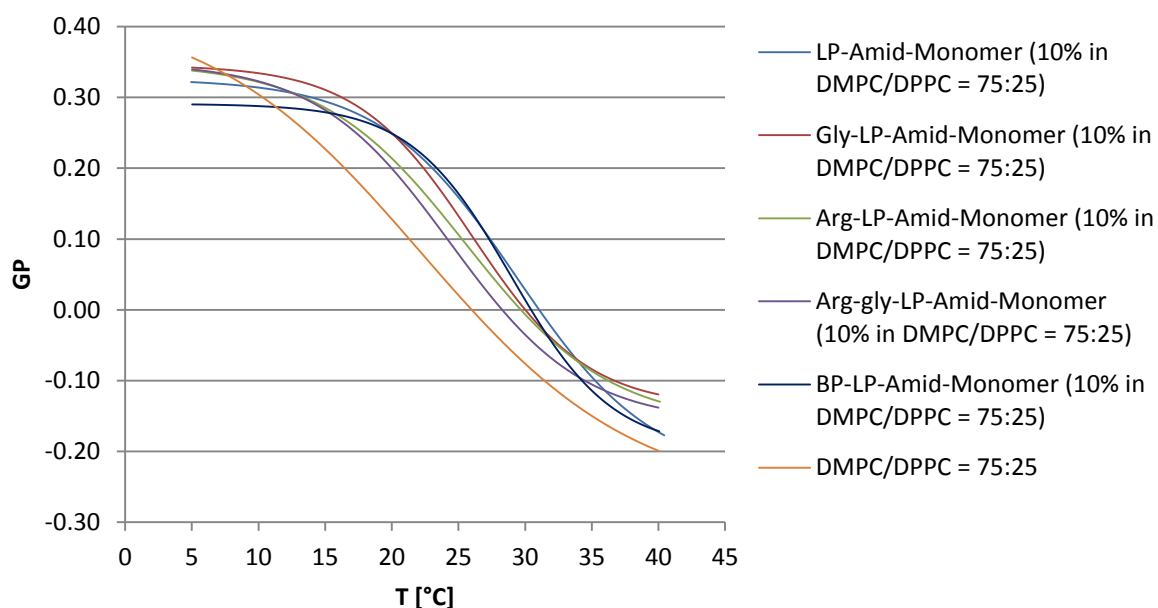


Abbildung 157: Gegenüberstellung der mit monomeren, funktionalisierten Lithocholsäure-Derivaten dotierten DMPC/DPPC-Liposomen (75 % - 25 %).

Tabelle 3: Charakteristische Werte der mit monomeren, funktionalisierten Lithocholsäure-Derivaten dotierten DMPC/DPPC-Liposomen (75 % - 25 %).

	DMPC/DPPC	LP-Amid	H ₂ N-LP-Amid	Arg-LP-Amid	Arg-gly-LP-Amid	BP(Oli) ₂ -LP-Amid
Dotierung [10 %]	75 %/25 %	71	73	93	94	75
T _c [°C]	22.16	29.38	26.03	25.53	24.35	28.96
GP-Wert (Gelphase)	0.35	0.31	0.34	0.33	0.34	0.29
GP-Wert (fluide Phase)	-0.27	-0.25	-0.13	-0.17	-0.15	-0.21
Phasenkoexistenzgebiet [°C]	10-47	15-45	10-40	10-40	10-40	20-40

Es zeigte sich, dass die Einlagerung von Lithocholsäure-Derivaten, unabhängig von der Art der Kopfgruppe, in allen untersuchten Fällen zu einer Erhöhung der Phasenübergangstemperatur T_c, im Vergleich zum undotierten Liposomen, führt. Hierbei fällt auf, dass der Einbau des unfunktionalisierten Lithocholsäure-N-methylpropargylamids (**71**) und des Bisphosphonat-Derivats **75** zu der größten Erhöhung der Phasenübergangstemperatur führen (ca. 7 °C). Die mono- und dikationischen Derivate **73**, **93** und **94** hingegen haben nur eine geringe Erhöhung der Umwandlungstemperatur zur Folge (2 °C - 4 °C). Zudem ist der Trend erkennbar, dass die Erhöhung der Ladung, des sterischen Anspruchs und das Vor-

handensein eines zusätzlichen flexiblen Linkers, wie im Falle des Bausteins **94**, einen weniger stabilisierenden Einfluss auf die umgebende Membran ausübt.

Dieser unterschiedlich starke Einfluss der Kopfgruppen soll im Folgenden durch den Vergleich mit dem Einbau von Cholesterol (**11**) in natürliche Membranstrukturen und dessen Einfluss auf die Fluidität der Doppelmembranen erfolgen. Die Hydroxylgruppen der Cholesterolmoleküle sind über Wasserstoffbrückenbindungen in der polaren Kopfregion der Doppelschichten verankert. Das starre Steroidgerüst tritt über hydrophobe Wechselwirkungen mit den Fettsäureresten im Inneren eines Blattes der Lipiddoppelschicht in Kontakt. Cholesterol (**11**) erhöht unterhalb der Phasenübergangstemperatur T_c die Fluidität der Membran, da es als "Fremdkörper" die geordnete Struktur der Alkylketten in der Gelphase stört. In der flüssig-kristallinen Phase oberhalb von T_c wird im Gegensatz dazu die Membranfluidität herabgesetzt, da das rigide Steran-Gerüst des Cholesterols (**11**) mit den Bewegungen der Kohlenwasserstoffketten interferiert. Durch den Einbau von Cholesterol (**11**) wird der Phasenübergangsbereich verbreitert und bei hohen Konzentrationen vollständig unterdrückt. Hierbei drängt es sich als "Weichmacher" zwischen die Fettsäureketten und verhindert die Kristallisation der Lipide.^[1,8,12,237,238]

Betrachtet man die Polarisationskurven der dotierten Membranen, so zeigt sich bei Temperaturen deutlich unterhalb und oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur ein ähnliches Verhalten (Abbildung 157). Im Vergleich zu den undotierten Liposomen weist der Zustand der Membran bei niedrigen Temperaturen eine höhere Polarität auf (geringere GP-Werte). Somit scheinen auch die Derivate **71**, **73**, **75**, **93** und **94** unterhalb von T_c die geordnete Struktur der Alkylketten in der Gelphase zu stören. Bei höheren Temperaturen ist der gegenteilige Effekt zu beobachten. Die undotierte Liposomenmembran besitzt in diesem Fall eine höhere Polarität als die dotierte. Auch dies steht im Einklang mit den in natürlichen Systemen gemachten Beobachtungen. Die rigiden Steroid-Gerüste der Derivate **71**, **73**, **75**, **93** und **94** erniedrigen die Fluidität der Membran, da sie mit der Bewegung der hydrophoben Lipid-Schwänze interferieren. Der zweite Sachverhalt scheint in allen betrachteten Systemen zu dominieren, da sonst die insgesamt erhöhten Phasenübergangstemperaturen nicht zu erklären sind.

Als mögliche Ursache für den unterschiedlich starken Einfluss der jeweiligen Kopfgruppen könnte das unterschiedlich starke Auftreten von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Phosphatidylcholinen und den Bausteinen **71**, **73**, **75**, **93** und **94** verantwortlich sein. Die unfunktionalisierte Hydroxy-Gruppe des Lithocholsäure-*N*-methylpropargylamids (**71**), die sowohl als Wasserstoffbrücken-Donor, als auch als Akzeptor wirken kann, übt den stabilisierendsten Einfluss auf die Membran aus. Die zweifach negative geladene Bis-

phosphosphonat-Einheit **75** übt einen vergleichbar starken Effekt aus. Neben auftretenden Wasserstoffbrückenbindungen ist hier eine zusätzliche chelatartige Komplexierung der Trimethylammonium-Einheit der Cholinkopfgruppe der Lipide denkbar, die ebenfalls zu einer starren Membrenumgebung führen kann. Mit der Einführung kationischer Kopfgruppen tritt der stabilisierende Effekt in den Hintergrund. Zum einen ist es denkbar, dass repulsive Wechselwirkungen der Zwitterionischen Cholinkopfgruppe und der positiv geladenen Kopfgruppe den Beitrag der Wasserstoffbrückenbindungen schwächen, denn es kann beobachtet werden, dass die Einführung einer weiteren positiven Ladung, im Falle der beiden Arginin-Derivate **93** und **94**, den stabilisierenden Beitrag im Vergleich zum Derivat **73** noch weiter verringert. Die Einführung eines zusätzlichen Linkers im Derivat **94** erhöht zudem den sterischen Anspruch und den Raumbedarf der Kopfgruppe, was sich in einer noch weniger stark ausgeprägten stabilisierenden Wirkung auf die Doppelmembran äußert. In den folgenden Untersuchungen mit den dimeren Derivaten **88**, **90**, **95**, **97** und **99** sollte sich zeigen, ob diese Vermutungen Bestand haben und zudem der Einfluss des starren Doppelsteroidgerüsts ermittelt werden.

3.4.6.2.4 Einlagerung dimerer Lithocholsäurederivate

Die Dotierung der 75 % DMPC/25 % DPPC-Liposomen mit den synthetisierten dimeren Lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Derivate **88**, **90**, **95**, **97** und **99** (5 %) wurde nach dem bereits erläuterten Verfahren, ebenfalls in Gegenwart von 1 % der Fluoreszenzsonde Laurdan (**24**) durchgeführt. Die dabei erhaltenen Ergebnisse folgen dem Trend, der auch bei den monomeren Bausteinen **71**, **73**, **75**, **93** und **94** beobachtet werden konnte. Das unfunktionalisierte Transmembransegment **95** und der dimere Bisphosphonatrezeptor **90** erhöhen die Phasenübergangstemperaturen im Bezug auf das undotierte Liposom im größten Maße (ca. 8 °C). Der für die kationischen Derivate **88**, **97** und **99** beobachtete Effekt, der eine geringe Stabilisierung der Membran verursacht, tritt auch im Fall der membrandurchspannenden Transmembranbausteine auf (Tabelle 4). Der Vergleich der jeweiligen Rezeptoren mit identischer Kopfgruppe, deren Konzentration durch Wahl der entsprechenden Dotierung konstant gehalten wurde, zeigt einen eindeutigen Einfluss der starren Zentralregion der Trans-

Tabelle 4: Charakteristische Werte der mit dimeren funktionalisierten Lithocholsäure-Derivaten dotierten DMPC/DPPC-Liposomen (75 %/25 %).

	DMPC/DPPC	LP-Amid	H ₂ N-LP-Amid	Arg-LP-Amid	Arg-gly-LP-Amid	BP(Oli) ₂ -LP-Amid
Dotierung [5 %]	75 %/25 %	95	88	97	99	90
T _c [°C]	22.16	30.38	27.05	26.59	26.59	30.38
GP-Wert (Gelphase)	0.35	0.32	0.36	0.37	0.34	0.33
GP-Wert (fluide Phase)	-0.27	-0.21	-0.14	-0.11	-0.11	-0.13
Phasenkoexistenzgebiet [°C]	10-47	15-45	10-40	10-40	15-45	20-40

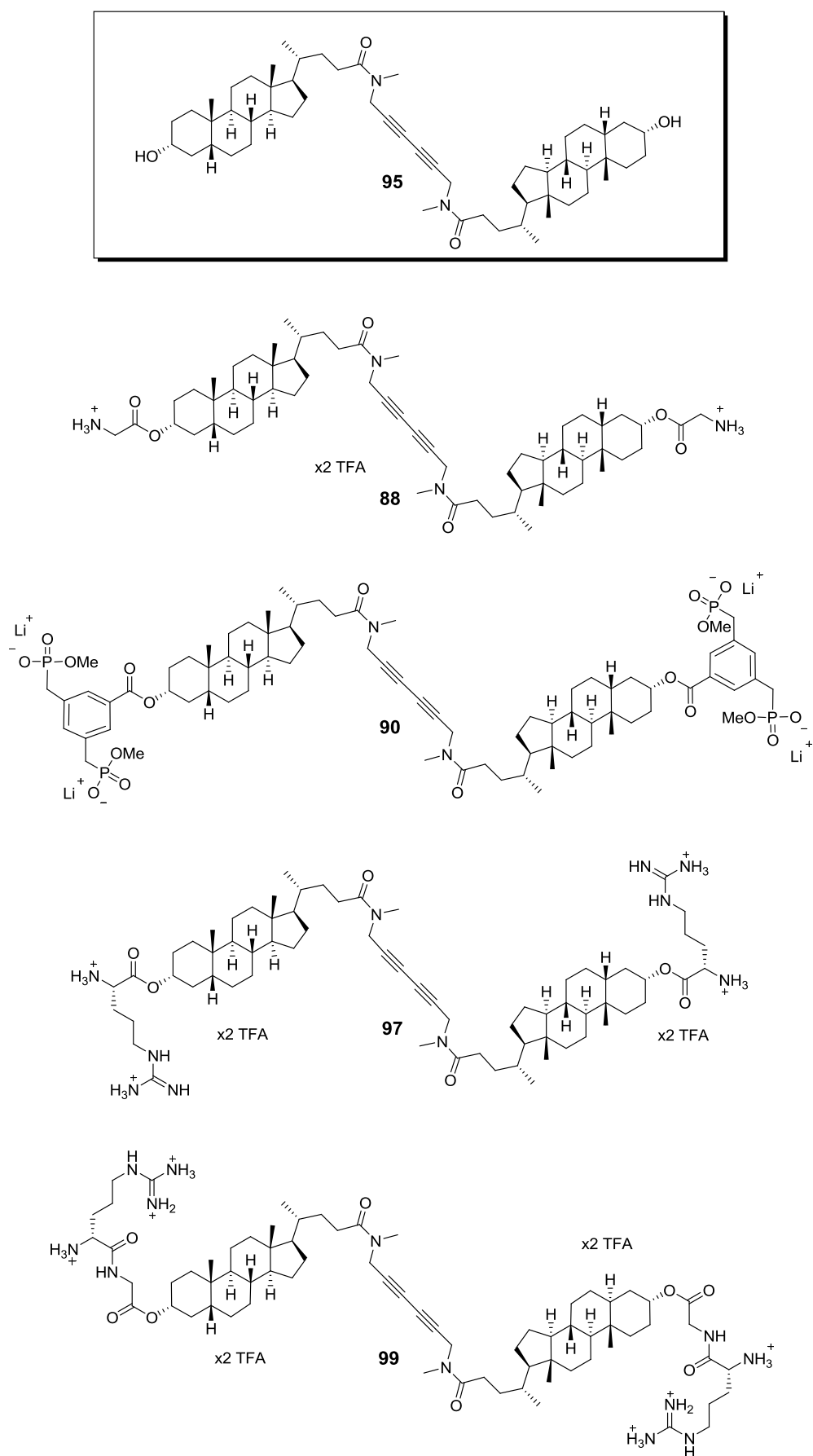


Abbildung 158: Einlagerung dimerer Lithocholsäurederivate.

membranbausteine **88**, **90**, **95**, **97** und **99** auf die Phasenübergangstemperatur T_c der untersuchten Liposomen und der damit einhergehenden Fluidität der Membran. Im Folgenden sollen die, durch die temperaturabhängigen Messungen erhaltenen Ergebnisse exemplarisch für die membrandurchspannenden Bausteine **90** und **99** dargestellt werden. In Abbildung 159 sind die Polarisationskurven für die Arginin-funktionalisierten Transmembranbausteine **93** und **97** ohne Glycin-Spacer gegenübergestellt. Wie bereits angeführt, führt die Einlagerung des Rezeptors **93** zu keiner signifikanten Erhöhung der Umwandlungstemperatur der DMPC/DPPC-Liposomen. Der Vergleich des monomeren und des dimeren Derivats zeigt aber eindeutig den Einfluss des starren Zentralsegments. Dieses führt zu einer weiteren Erhöhung der Umwandlungstemperatur bezogen auf das undotierte Liposom.

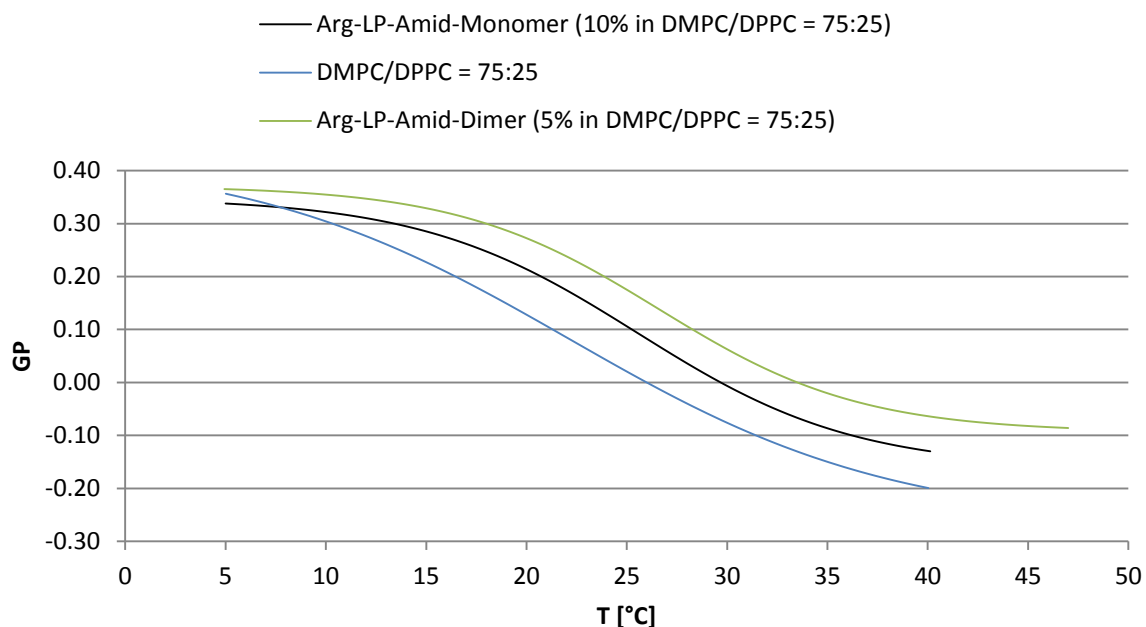


Abbildung 159: Vergleich des Phasenverhaltens 93- und 97-dotierter DMPC/DPPC-Liposomen.

Betrachtet man des Weiteren den Einfluss auf die Polariät der jeweils vorligen Phase oberhalb und unterhalb der Phasenübergangstemperatur, so zeigt sich auch hier der zusätzliche Einfluss. Unterhalb von T_c erfolgt eine leichte Erhöhung der Polarität und damit verbunden, eine leichte Erhöhung der Fluidität, wohingegen oberhalb von T_c eine weitere Einschränkung der Mobilität der Membran erfolgt. Dieser, auf Einführung der starren Zentralregion basierende, stabilisierende Effekt, lässt sich durch die zusätzliche Störung der Membranstruktur zurückführen. Bei der Dotierung mit monomeren Membransegmenten **71**, **73**, **75**, **93** und **94** kommt es vorwiegend zu einer Störung der Membranstruktur innerhalb eines Blattes der Lipiddoppelschicht, wohingegen ein membrandurchspannender Baustein zusätzlich eine Störung der gesamten Doppelschichtstruktur zu Folge haben sollte und so die Wechselwirkungen zwischen den hydrophoben Alkylketten noch weiter behindert.

Für den Bisphosphonatrezeptor **90** kann ein identischer Sachverhalt bezüglich der Störung der Membran beobachtet werden. Auch durch Einlagerung dieses Rezeptors wird die Phasenübergangstemperatur nochmal um weitere 2 °C erhöht (Abbildung 160). Die bereits im vorigen Kapitel postulierte Komplexierung der Cholinkopfgruppe, die zu einer zu-

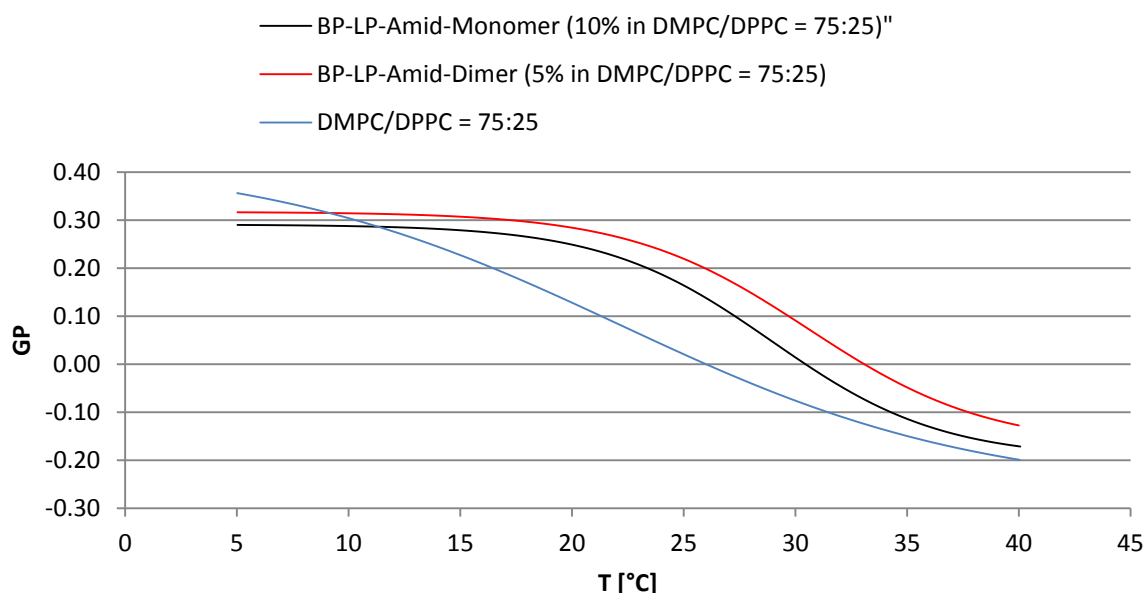


Abbildung 160: Vergleich des Phasenverhaltens 75- und 90-dotierter DMPC/DPPC-Liposomen.

sätzlichen Erhöhung der Umwandlungstemperatur durch die Einlagerung des Bisphosphonaterezeptors **90** führt, ist nochmals schematisch in Abbildung 161 dargestellt.

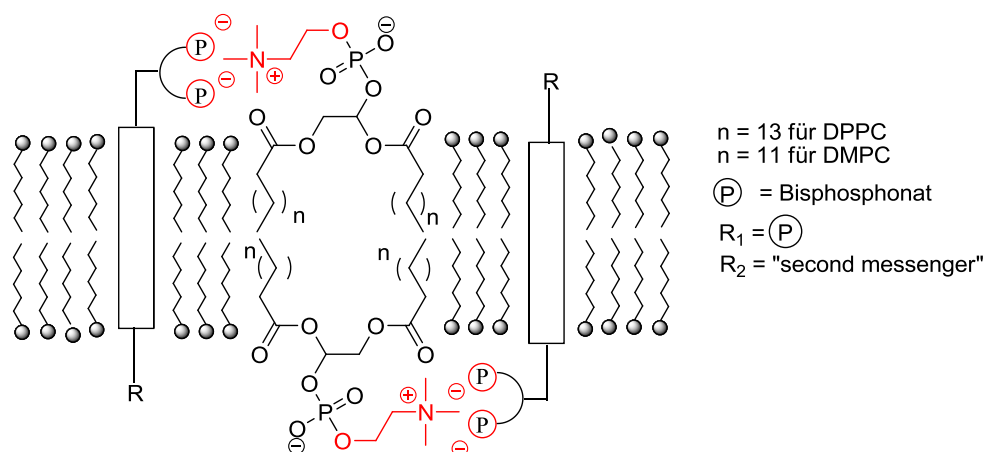


Abbildung 161: Mögliche Erklärung der erhöhten Phasenübergangstemperaturen bei Dotierung mit BP-Steroidderivaten.

Zusammenfassend lässt sich aus den erhaltenen Ergebnissen folgern, dass die Einlagerung der Rezeptoren **66** und **67** zwar einen messbaren Einfluss auf die Mobilität innerhalb der Liposomen hat, diese aber trotz der leicht erhöhten Phasenübergangstemperaturen T_c , die Signaltransduktion nicht behindern sollte, da auch im Temperaturbereich der eigentlichen Signaltransduktionsexperimente eine hinreichende Mobilität der Membran vorhanden ist.

3.4.7 Ausschluss der Membranpermeabilität von DPPC-Liposomen für den Botenstoff DET

Die bisherigen Experimente haben gezeigt, dass es unter Verwendung des Botenstoff DET möglich ist, einen Energie-Transfer zwischen den Rezeptoren **66** und **67**, die in Liposomen eingelagert wurden, zu induzieren.

Um aber den Nachweis erbringen zu können, dass es sich bei dem beobachteten Energie-Transfer tatsächlich um eine unidirektionale und transmembrane Signaltransduktion handelt, müssen vor allem zwei entscheidende Sachverhalte bestätigt werden. Eine transmembrane Natur der Signaltransduktion setzt voraus, dass die Rezeptoren **66** und **67** in einer membrandurchspannenden, gestreckten Konformation in die Lipiddoppelschicht eingelagert sind. Damit es sich unter der Annahme einer gestreckten Einlagerungsgeometrie der Transmembranrezeptoren **66** und **67** zudem noch um eine gerichtete, unidirektionale Signalübertragung handelt, muss ausgeschlossen werden, dass die Lipiddoppelschicht der Liposomen für den Botenstoff DET permeabel ist. Nur in diesem Fall kann die Ausbildung des ternären Komplexes zwischen den Bisphosphonatpinzetten und dem Botenstoff ausschließlich auf der extrazellulären Seite der Membran stattfinden und den FRET-Effekt im intrazellulären Kompartiment der Liposomen induzieren. Für den Fall einer vorhandenen Permeabilität der Doppelmembran für das zugesetzte DET, kann die Erkennung des Botenstoffs sowohl im intra-, als auch im extrazellulären Medium stattfinden und die Signalleitung würde beide Richtungen ablaufen. Diese Konstellation würde außerdem eine Steigerung des Signals auf das Doppelte hervorrufen, da nunmehr ein Drittel und nicht mehr ein Sechstel aller Rezeptoren zur Bildung produktiver Dimere befähigt wäre.

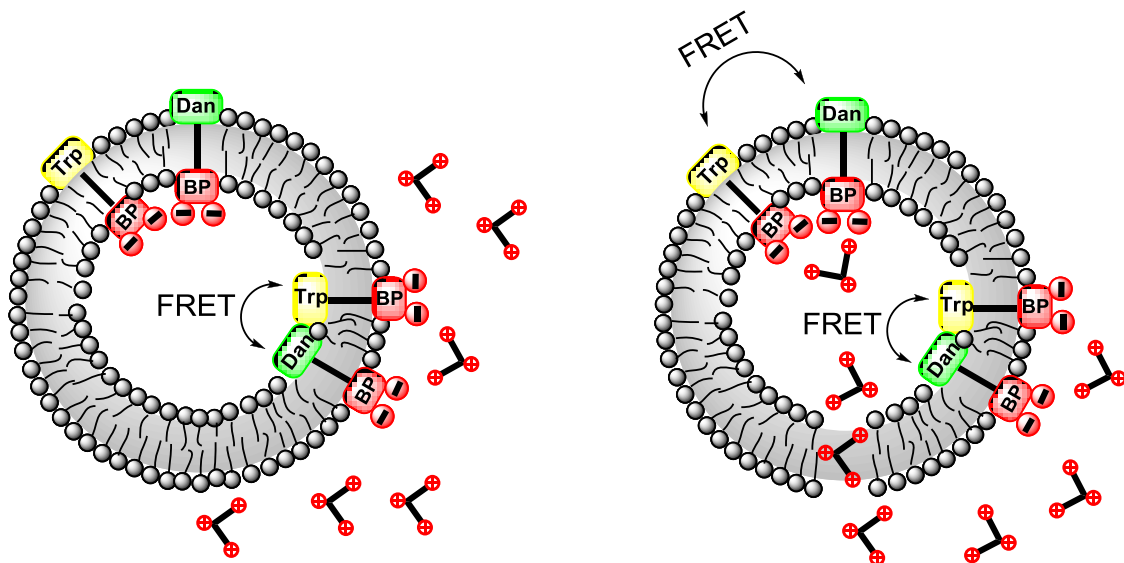


Abbildung 162: links: Unidirektionale Signalleitung bei einer, für den Botenstoff nicht permeablen Membran; rechts: Ungerichtete Signaltransduktion im Fall eines membrangängigen Botenstoffs.

Um diesen Sachverhalt auszuschließen, wurden DPPC-Liposomen mit dem Botenstoff DET gefüllt. Hierzu wurde ein dünner Film des Liposomenmaterials DPPC in MES-Puffer unter Zugabe von 100 eq. des Triamins aufgenommen, über die Phasenübergangstemperatur erwärmt und für mehrere Minuten gevortext. Um die Inklusion zu vervollständigen, wurden die multilamellaren Vesikel in mehreren Gefrier-Tau-Zyklen erst in flüssigem Stickstoff eingefroren und danach langsam über die Phasenübergangstemperatur von 41 °C erwärmt. Nach Extrusion der Liposomenlösung durch eine Polycarbonatmembran wurde die Lösung unilamellarer Liposomen, mit Hilfe einer Sephadex G-60 beladenen Säule von Resten des extrazellulären Botenstoffs befreit. Im Fall einer permeablen Membran sollte die Konzentration des Triamins im extravasikulären MES-Puffer mit der Zeit ansteigen.

Um diesen Konzentrationsanstieg nachweisen zu können, wurde zu der Liposomenlösung ein Überschuss an Ninhydrin-Farbreagenz zugegeben, das die Freisetzung des DET in das äußere wässrige Medium durch Bildung eines farbigen Komplexes detektierbar macht (Abbildung 163). Hierzu wurde das Absorptionsmaximum des Ninhydrin-Farbkomplexes

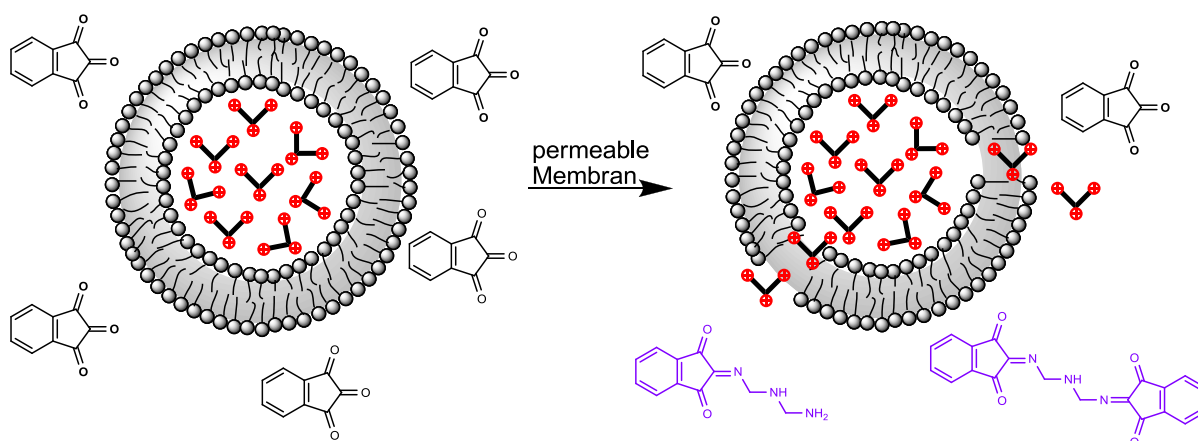


Abbildung 163: Nachweis der möglichen Membranpermeabilität von DPPC-Liposomen für den Botenstoff DET.

bei einer Wellenlänge von 560 nm über einen Zeitraum von 35 min verfolgt. Dieser Zeitraum entspricht in etwa dem Zeitraum, den der Botenstoff DET benötigt, den maximalen FRET-Effekt zwischen den Rezeptoren **66** und **67** zu induzieren. Betrachtet man die Absorptionsspektren innerhalb dieses Zeitraums, so ist die Ausbildung des farbigen Ninhydrin-Komplexes nicht nachzuweisen (Abbildung 164).

Um die tatsächliche Inklusion des Triamins in die Liposomen sicherzustellen, sollte der eingeschlossene Botenstoff vollständig freigesetzt und über das zugesetzte Ninhydrinreagenz detektiert werden. Die Freisetzung erfolgte durch Zerstörung der liposomalen Vesikelstruktur mittels des Detergenzes Triton X (Abbildung 165). Direkt nach der Zugabe war die Ausbildung des farbigen Komplexes zu beobachten (Abbildung 164). Durch UV-Vis-

Messungen über einen Zeitraum von weiteren 35 min konnte ein konstanter Anstieg der Absorption bei 560 nm nachgewiesen werden (Abbildung 164).

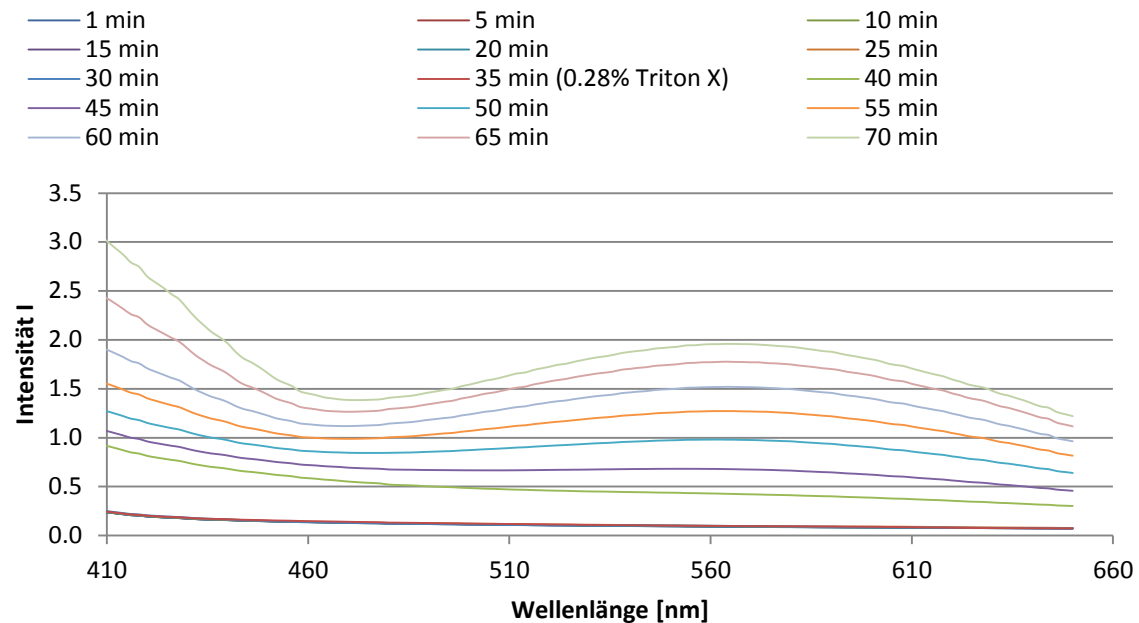


Abbildung 164: 2 mmol/L DPPC + 100 eq. DET (intern) + 400 eq. Ninhydrin (extern).

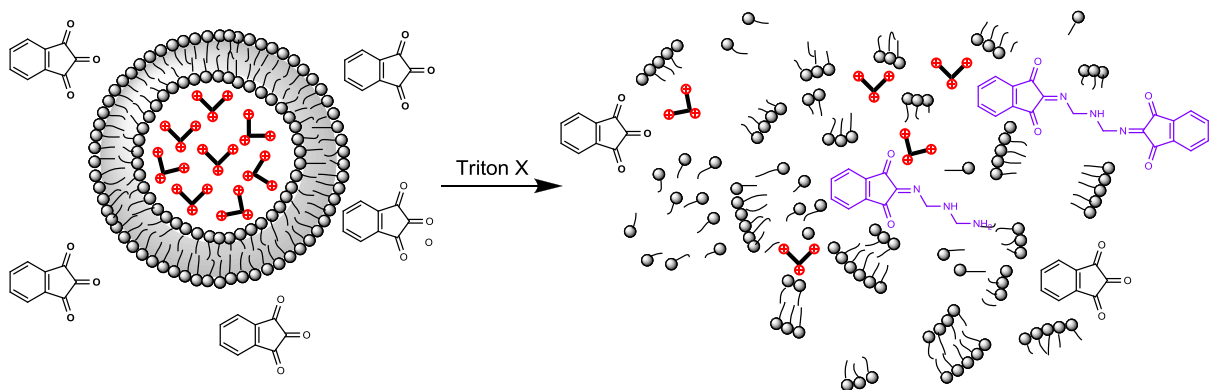


Abbildung 165: Zugabe des Detergenz Triton X zu DET gefüllten DPPC-Liposomen.

Durch Referenzexperimente konnte die erhaltenen Ergebnisse abgesichert und bestätigt werden. Durch Zugabe des Ninhydrin-Reagenz zu der Liposomen-Lösung, kann in Abwesenheit des Botenstoffs DET kein Anstieg der UV-Absorption beobachtet werden. Die Zugabe beider Komponenten in das äußere wässrige Medium löst erwartungsgemäß den, in Abbildung 164 beobachteten Anstieg der Absorption aus. Somit ist der Beweis erbracht, dass der, bei den Signaltransduktionsexperimenten mit den Rezeptoren **66** und **67** beobachtete Energie-Transfer zwischen den beiden Fluorophoren ausschließlich auf der Membranaußen-seite induziert wurde. Unter der Annahme einer gestreckten Einlagerung der Rezeptoren **66** und **67** ist eine unidirektional gerichtete Signaltransduktion somit ebenfalls bewiesen.

3.4.8 Bestimmung der Einlagerungsgeometrie

Nachdem zuvor die Permeabilität der Lipiddoppelschicht für den eingesetzten Botenstoff DET ausgeschlossen werden konnte und somit eine der Grundvoraussetzungen für eine unidirektional gerichtete Signaltransduktion erfüllt ist, muss eine der wichtigsten Fragestellungen im Rahmen dieses Projekts zur künstlichen transmembranen Signaltransduktion, die Einlagerungsgeometrie der Rezeptoren **66** und **67** in der Lipiddoppelschicht der Liposomen, geklärt werden. Für die Einlagerung der Rezeptoren **66** und **67** gibt es zwei denkbare Anordnungen in der Membran. Zu einen die gestreckte, membrandurchspannende und zum anderen die „U-förmige“ Einlagerung, bei der sich Erkennungseinheiten und Fluorophore eines Rezeptors auf derselben Seite der Membran befinden (Abbildung 166).

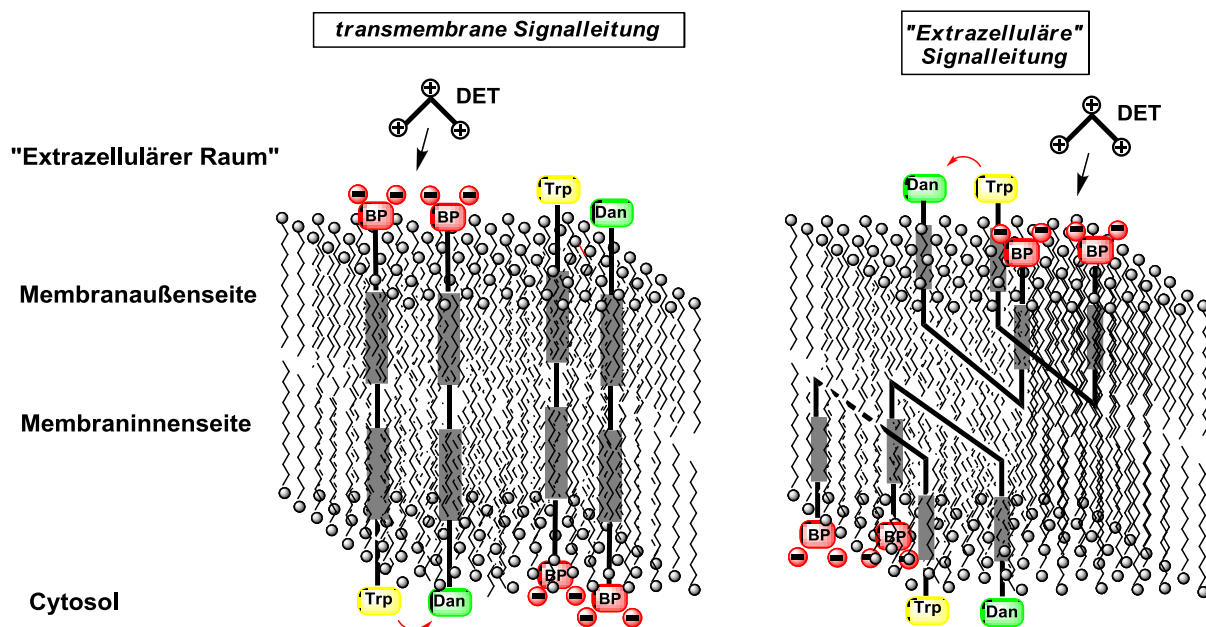


Abbildung 166: Mögliche Einlagerungsgeometrien der Rezeptoren **66** und **67**.

Im Falle der „U-förmigen“-Einlagerung würde ebenfalls ein FRET-Effekt, induziert durch die Zugabe des Botenstoffs, detektierbar sein. Allerdings ist in dieser Anordnung nicht von einer echten Signaltransduktion zu sprechen, da die Signalweiterleitung auf der Membranaußenseite erfolgen würde. Eine transmembrane Natur der Signaltransduktion setzt voraus, dass die Rezeptoren **66** und **67** in einer membrandurchspannenden, gestreckten Konformation in die Lipiddoppelschicht eingelagert sind.

Erste Hinweise, dass dimere Transmembranerüste auf Lithochol-, bzw. Cholensäure-Basis membrandurchspannend in eine Lipiddoppelschicht eingelagert sind, konnten von *Hunter et al.* und *Schrader et al.* erhalten werden.^[143,146,174,176] Das erste System von *Hunter et al.* wurde in einem vorangehenden Reduktionsschritt aktiviert. Hierfür sind nur die extrazellulären Disulfidgruppen des eingelagerten Transmembranbausteins **44** zugänglich. Durch den

signalinduzierenden Oxidationsschritt konnte eine weitere Freisetzung des sekundären Botenstoffs 2-Thiopyridin detektiert werden (Abbildung 167). Diese Abspaltung kann somit nur im intrazellulären Kompartiment stattgefunden haben. Die detektierte Reaktionsfolge ist nur bei einer membrandurchspannenden Einlagerung der Transmembranbausteine **43** und **44** möglich.^[143]

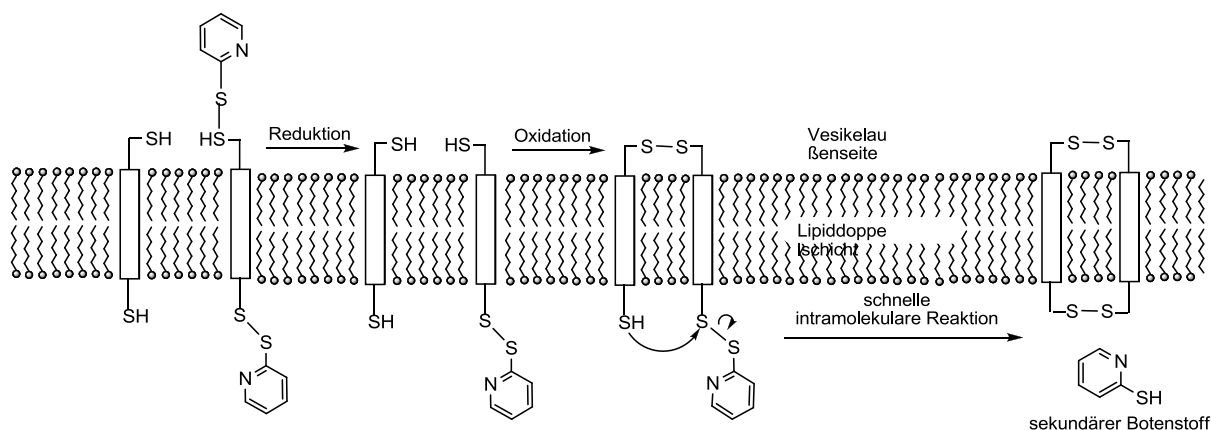


Abbildung 167: Indirekter Einlagerungsbeweis im Hunterschen Signaltransduktionssystem.^[143]

Dieselben Hinweise auf eine gestreckte Einlagerung der Transmembranrezeptoren **59** und **60** konnte Maue in seinem System zur amin-induzierten Signaltransduktion erhalten (Abbildung 168).^[174] Durch Zugabe des Botenstoffs DET war ein Anstieg der Absorption, verursacht durch die Freisetzung von 2-Thiopyridin, zu verzeichnen. Durch die Zugabe

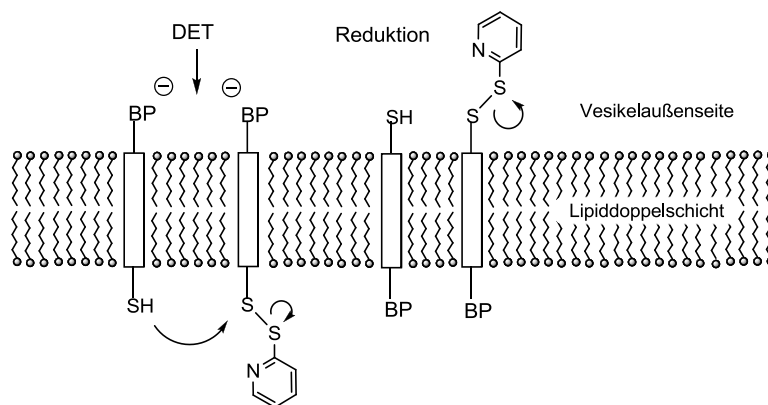


Abbildung 168: Indirekter Einlagerungsbeweis im Signaltransduktionssystem nach Maue.^[174]

eines Reduktionsmittels konnte auch bei diesem System eine weitere Freisetzung des sekundären Botenstoffs ausgelöst werden. Die Zugabe der Reagenzien in umgekehrter Reihenfolge zeigte den gleichen Effekt. Bei einer „U-förmigen“ Einlagerung der Transmembransegmente hätten nach der Zugabe des Reduktionsmittels alle zugänglichen Disulfid-Gruppen deaktiviert sein sollen, so dass auf Zugabe des DET kein weiterer Anstieg mehr zu verzeichnen sein dürfte. Da bei beiden Systemen, die bereits in Kapitel 1.6 beschriebenen Detektionsprobleme durch Trübungseffekte und vorzeitige Reaktion der Rezeptoren bei der Liposomenprä-

paration auftraten, können diese Ergebnisse allenfalls als Hinweis auf eine transmembrane Orientierung der eingelagerten Bausteine gewertet werden. In einem weiteren, von *Hunter et al.* vorgestellten System (Abbildung 169; vgl. Kapitel 1.6), wurde die kooperative Bindung von Kupfer-Ionen durch den Rezeptor **48** nachgewiesen. Die deutlich erhöhte Bindungskonstante im Vergleich zum halben Transmembransegment **46**, ist zum eine durch die

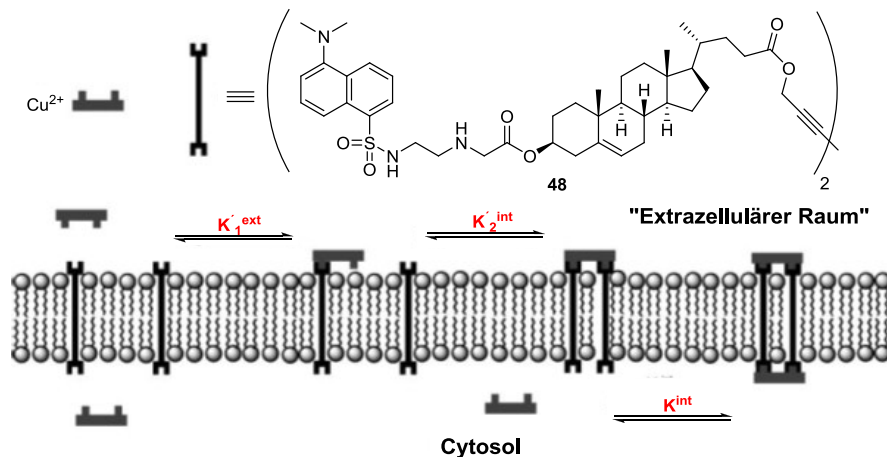


Abbildung 169: Kooperative Bindung auf beiden Seiten einer Doppelmembran nach *Hunter et al.*^[145]

Membrangängigkeit der zugesetzten Kupfer-Ionen, zum anderen durch eine membrandurchspannende Orientierung des Rezeptors **48** begründet.

Diese Annahme ist unter der Voraussetzung, dass die starren Cholesterin-Dimere eine gestreckte Einlagerung bevorzugen durchaus statthaft. Zu Bedenken ist allerdings, dass bei einer „U-förmigen“ Orientierung und einer permeablen Membran für die Kupfer-Ionen, ebenfalls alle Bindungsstellen erkannt und pro Rezeptor-Molekül ebenfalls zwei Kupfer-Ionen gebunden werden können, was faktisch zu den selben erhöhten Bindungskonstanten führen sollte. Gegen eine „U-förmige“ Einlagerung spricht bei allen betrachteten System, dass die zentrale Dialkin-Einheit der Rezeptoren in dieser Geometrie zwischen den Blättern der Doppelmembran lokalisiert wäre. Dies würde wiederum zu einer erheblichen Störung der liposomalen Struktur führen.

Für unser Modell-System mit FRET-Readout soll die Einlagerungsgeometrie im Folgenden durch ein speziell für diesen Nachweis entwickeltes Experiment nachgewiesen werden. Wie bereits einleitend beschrieben, sollte zu diesem Zweck zuerst der Transmembranbaustein **85** synthetisiert werden, der anstelle mit der Bisphosphonat-Einheit, terminal mit dem zweiten Fluorophor funktionalisiert ist. Die Detektion mittels FRET bietet auch hier den Vorteil, dass das System und die Lage der Fluorophore in einem stabilen Zustand untersucht werden können, da keine Desaktivierung erfolgen kann. Die Unterscheidung der beiden Einlagerungsmöglichkeiten des Transmembranbausteins **85** sollte über das Experiment wie folgt möglich sein:

1. Gestreckte Konformation des Transmembranbausteins 85:

Bei einer gestreckten Einlagerung des Bausteins 85 sind die beiden Fluorophore auf den beiden Seiten der Doppelmembran bei niedrigen Konzentrationen sehr weit voneinander entfernt sein. Daher sollte kein intermolekularer FRET-Effekt detektierbar sein. Mit einer steigenden Dotierung in der Membran, steigt auch die Energieübertragung vom Donor auf den Akzeptor (Abbildung 170 links). Die FRET-Effizienz steigt somit konzentrationsabhängig von 0 % bis auf ein Maximum an.

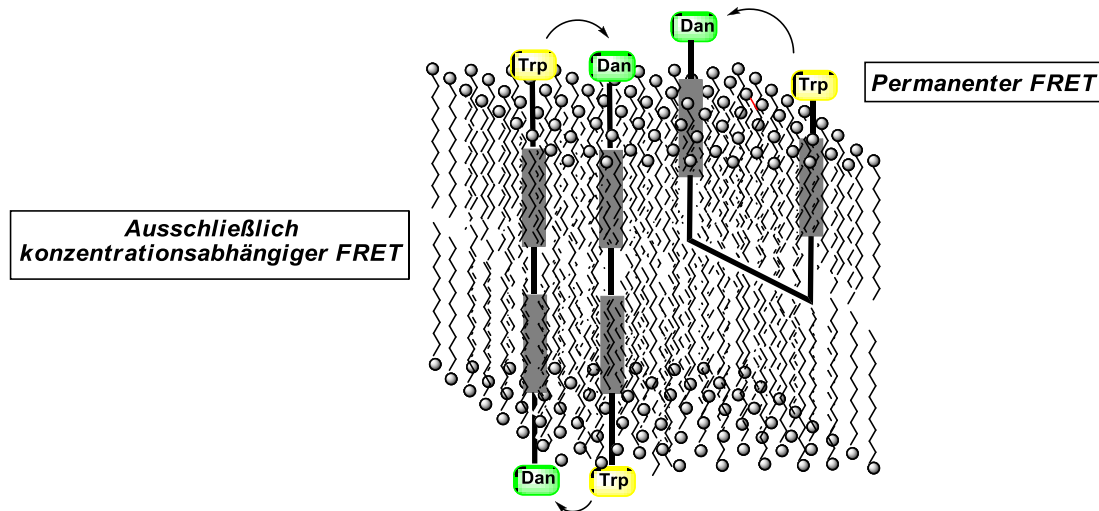


Abbildung 170: Mögliche Bestimmung der Einlagerung des Transmembranbausteins 85.

2. „U-förmige“ Konformation des Transmembranbausteins 85:

Bei einem „U-förmigen“ Einbau in die Membran befinden sich die beiden Fluorophore konzentrationsunabhängig auf einem, durch den Aufbau des Transmembransegments vorgegebenen konstanten Abstand (Abbildung 170 rechts). Hierdurch ist auch schon bei sehr geringen Konzentrationen ein messbarer Energietransfer vom Donor auf den Akzeptor zu detektieren. Mit steigender Konzentration in der Membran steigt der konstante, permanente FRET ebenfalls um den Betrag, der durch den konzentrationsabhängigen intermolekularen Energietransfer hinzukommt. Die FRET-Effizienz steigt somit konzentrationsabhängig von einem konstanten Anfangswert bis auf ein Maximum an.

Durch Referenzmessungen mit dem Rezeptor 66, in Abwesenheit des Dansyl-Akzeptors 67, kann bei der jeweiligen Konzentration bestimmt werden, ob ein Energietransfer vorliegt und die Effizienz berechnet werden. Dies sollte die Unterscheidung der beiden denkbaren Einlagerungsgeometrien ermöglichen.

3.4.8.1 Synthese des heterodimeren Transmembranbausteins 85

Die Synthese des heterodimeren Transmembranbausteins **85** sollte von *L. Bartsch* im Rahmen ihrer Bachelor-Arbeit durchgeführt werden.^[239] Da die weiteren Synthesen und Untersuchungen des Bausteins **85** auf diesen Ergebnissen aufbauen, sollen diese im Folgenden kurz vorgestellt werden.

Um den synthetischen Aufwand möglichst gering zu halten, sollte die Synthese der Zielverbindung **85** durch eine Glaser-Kupplung der halben Bausteine **86** und **100** erfolgen. Das Transmembransegment **86** mit Tryptophan-Kopfgruppe war bereits im Rahmen der Synthese des Rezeptors **66** erfolgreich hergestellt worden. Der halbe Baustein **100** mit Dansyl-Kopfgruppe konnte über das, in der Synthese des Rezeptors **67**, etablierte Syntheseprotokoll durch Umsetzung des Gerüstbausteins **73** mit Dansylchlorid in hohen Ausbeuten erhalten werden.

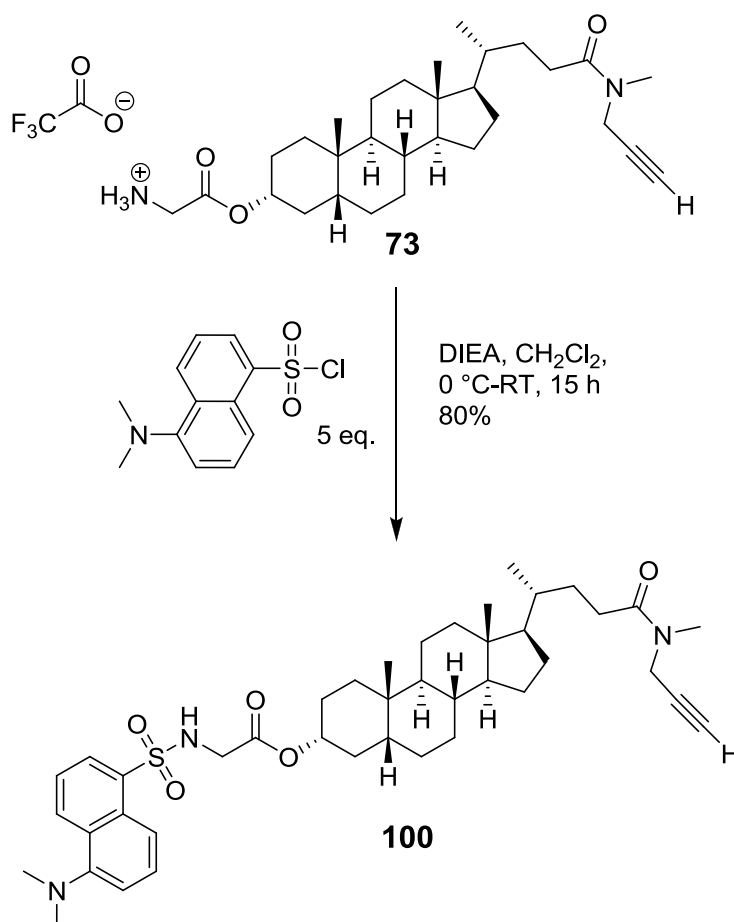


Abbildung 171: Synthese der Dansyl-Akzeptor-Einheit **100**.

Über die nachfolgende kupfervermittelte Kupplung der Bausteine **86** und **100** konnte die Zielverbindung **85** neben den beiden Homokupplungsprodukten zwar synthetisiert und auch massenspektrometrisch nachgewiesen werden, allerdings konnten die drei entstande-

nen Dimere aufgrund der sehr ähnlichen Polaritäten auch durch mehrfache säulenchromatographische Reinigung nicht vollständig voneinander getrennt werden. Um die Trennung der drei Verbindungen zu erleichtern, sollten die *N*-Boc-geschützte Tryptophan-Einheit der Zielverbindung **85** und des Tryptophan-Dimers in das freie Amin überführt

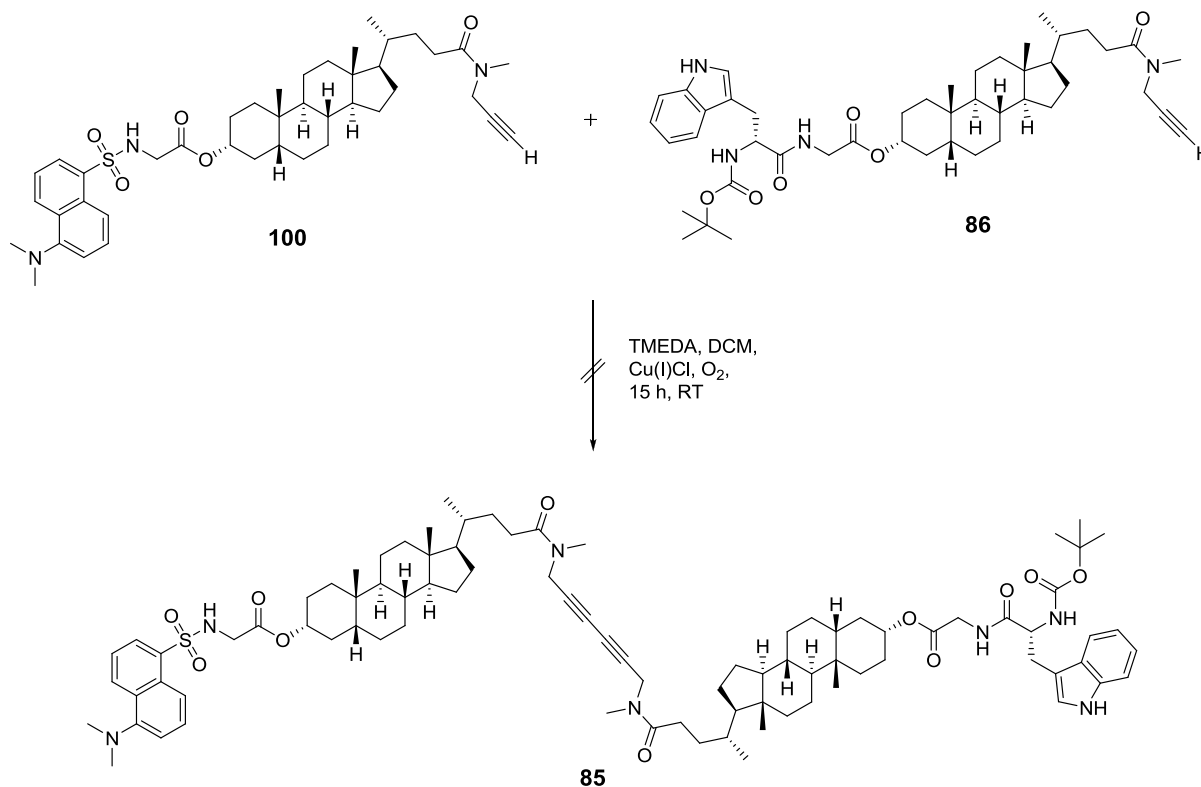


Abbildung 172: Synthese des unsymmetrischen Transmembranbausteins **85** mit Donor- und Akzeptor-Einheit.

werden. Die Behandlung mit Trifluoressigsäure in Dichlormethan führte allerdings zur Bildung weiterer Nebenprodukte. Über eine erneute säulenchromatographische Trennung konnte auch das entschützte Derivat des heterodimeren Transmembranbausteins **85** nicht isoliert werden.

Um das säulenchromatographische Trennproblem zu lösen, wurden von *L. Bartsch* in einer alternativen Syntheseroute die Bausteine **100** und **72** mittels Glaser-Kupplung dimerisiert. Die drei entstandenen Dimere sollten aufgrund der veränderten Polarität der Kopfgruppe besser voneinander zu trennen sein. Der veränderte Aufbau des Dimers **101** ermöglichte eine nicht ganz vollständige Trennung der drei dimerisierten Lithocholsäure-Derivate. Die Zwischenstufe **101** konnte mit einer Ausbeute von immerhin 15 % isoliert werden. An der Verbindung **101** sollte im Folgenden die *N*-Boc-Schutzgruppe des Glycin-Spacers unter Zusatz von Trifluoressigsäure abgespalten werden und die Tryptophan-Einheit über den Glycin-Linker angeknüpft werden. Zum Ausschluss weiterer Nebenreaktionen wurde der halbe Baustein **100** in einer Testreaktion unter den Bedingungen der Boc-Entschützung für

24 h bei RT gerührt. Nach der Entfernung der Trifluoessigsäure konnte die Ausgangsverbindung **100** ohne Bildung von Nebenprodukten in quantitativer Ausbeute zurückgewonnen

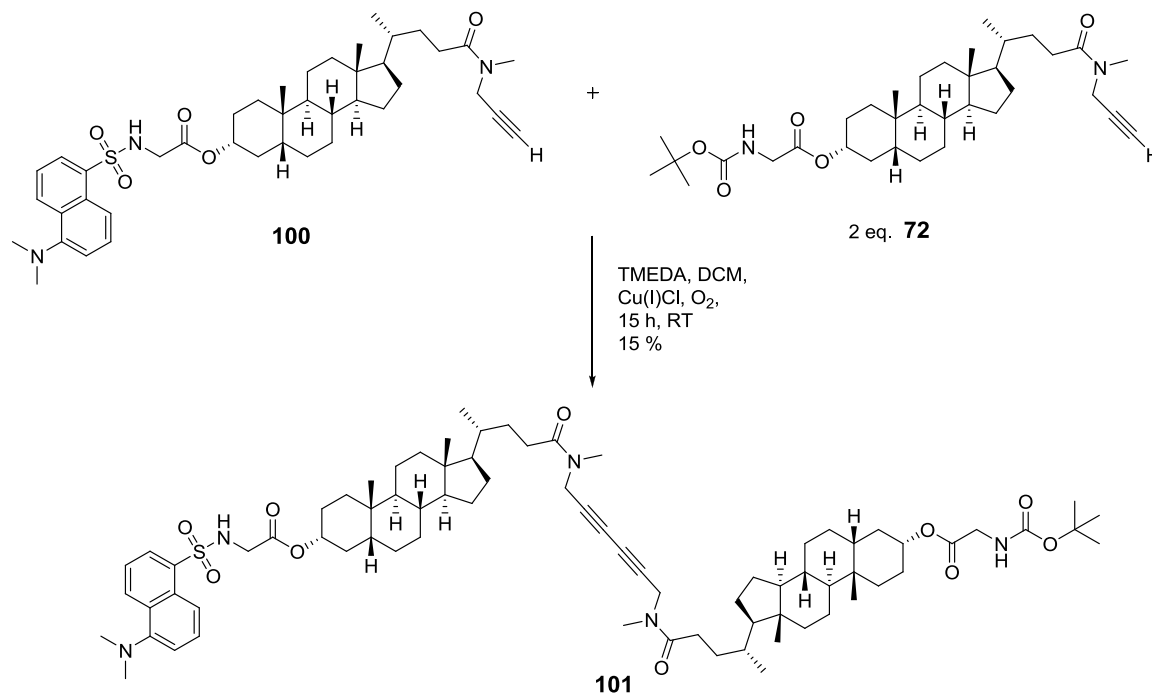


Abbildung 173: Synthese des funktionalisierten Lithocholsäure-Dimers **101**.

werden. Die Entschützung der heterodimeren Verbindung **101** verlief erwartungsgemäß ohne weitere Probleme und lieferte die Verbindung **102** mit freiem Glycin-Linker mit quantitativem Umsatz.

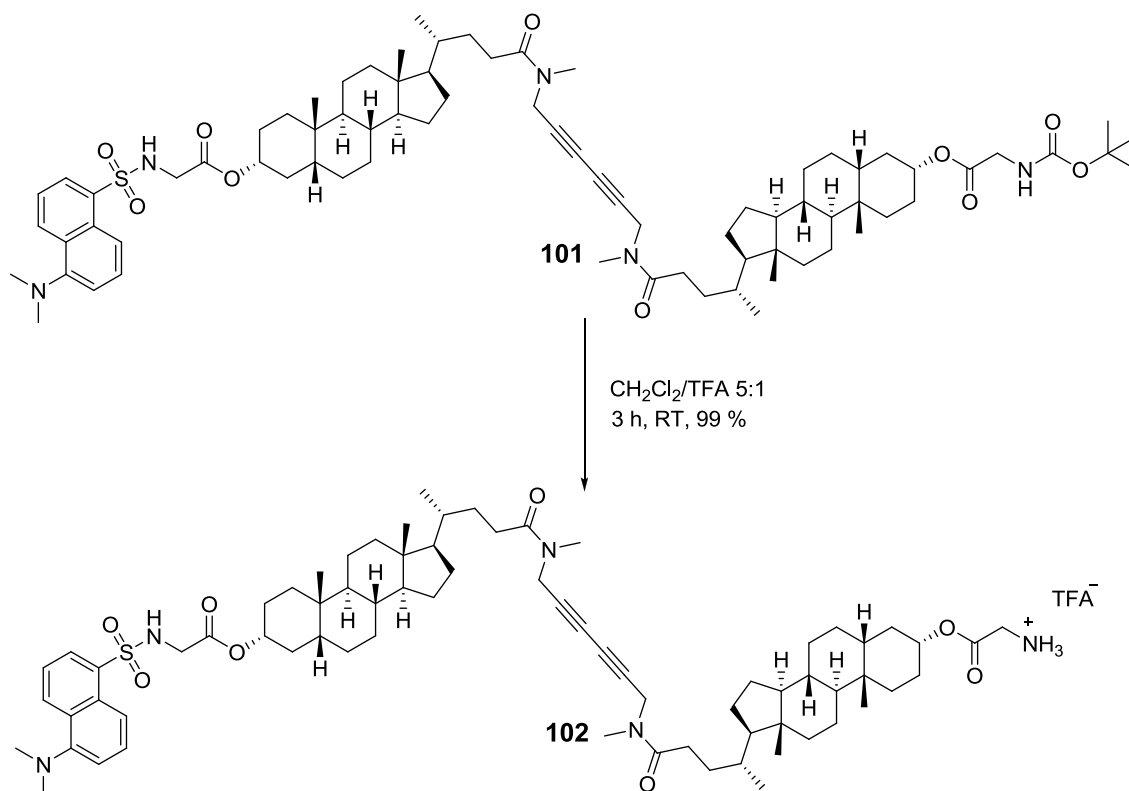


Abbildung 174: Entschützung des dimeren Lithocholsäurebausteins **101**.

Im letzten Schritt der Synthese sollte die so erhaltene Zwischenstufe nach dem bekannten HCTU-Kupplungsprotokoll unter hoher Verdünnung mit *N*-Boc-tryptophan zur heterodimeren Zielverbindung **85** umgesetzt werden. Auch bei dieser Synthese stellte sich die säulenchromatographische Reinigung der Verbindung **85** als besonders aufwendig heraus. Zuerst wurden in reinem Ethylacetat Reste der Kupplungsreagenzien abgetrennt und

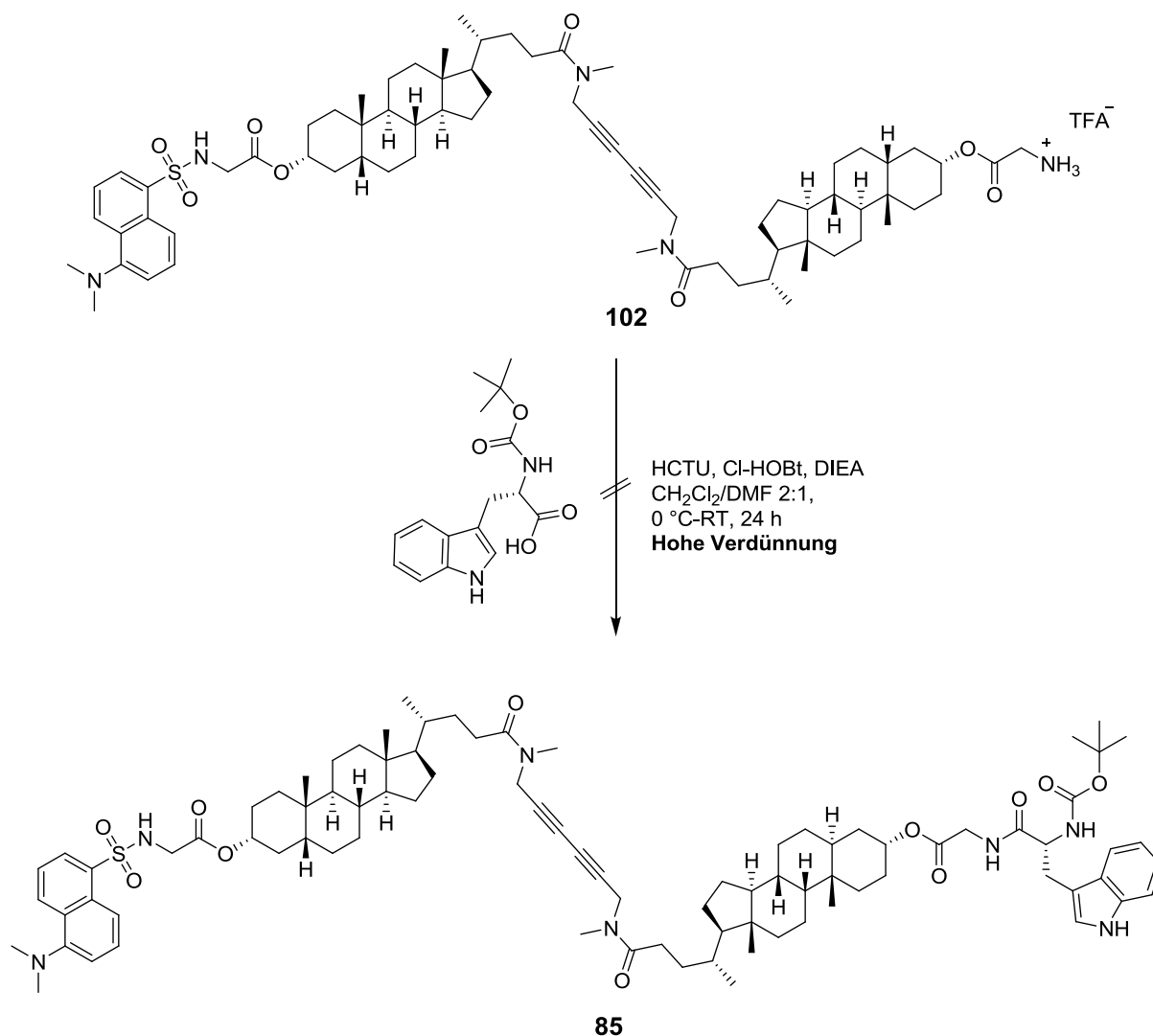


Abbildung 175: Alternative Synthese des unsymmetrischen Transmembranbausteins **85** mit Donor- und Akzeptor-Einheit.

anschließend das Laufmittel auf Dichlormethan : Methanol umgestellt. Hierbei konnte die Zielverbindung **85** nicht in Reinform erhalten werden. Eine weitere Reinigung unter Verwendung eines weniger polaren Laufmittelgemischs führte ebenfalls nicht zu gewünschten Erfolg. ^1H -NMR-Untersuchungen zeigten zwar die Bildung des gewünschten Produkts, doch konnte dieses nicht von den vorliegenden Verunreinigungen getrennt werden.

In einem letzten Versuch, eine alternative Syntheseroute zur Lösung der aufgetretenen Probleme zu finden, wurde die Strategie der Synthese nochmals vollständig überarbeitet. Die Einführung der beiden Fluorophore sollte in den letzten beiden Schritten der Synthese erfolgen. Zum Aufbau des Lithocholsäure-Dimers sollten zwei orthogonal geschützte Glycin-lithocholsäure-Derivate dimerisiert werden. Hierzu wurde Fmoc-geschütztes Glycin mit dem bekannten Lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid (**71**) HCTU-vermittelt verestert. Die Reaktion verlief ohne weitere Probleme und lieferte das Fmoc-geschützte Derivat **103** in sehr guten Ausbeuten. An der so erhalten Verbindung **103** wurde die Fmoc-Schutzgruppe in

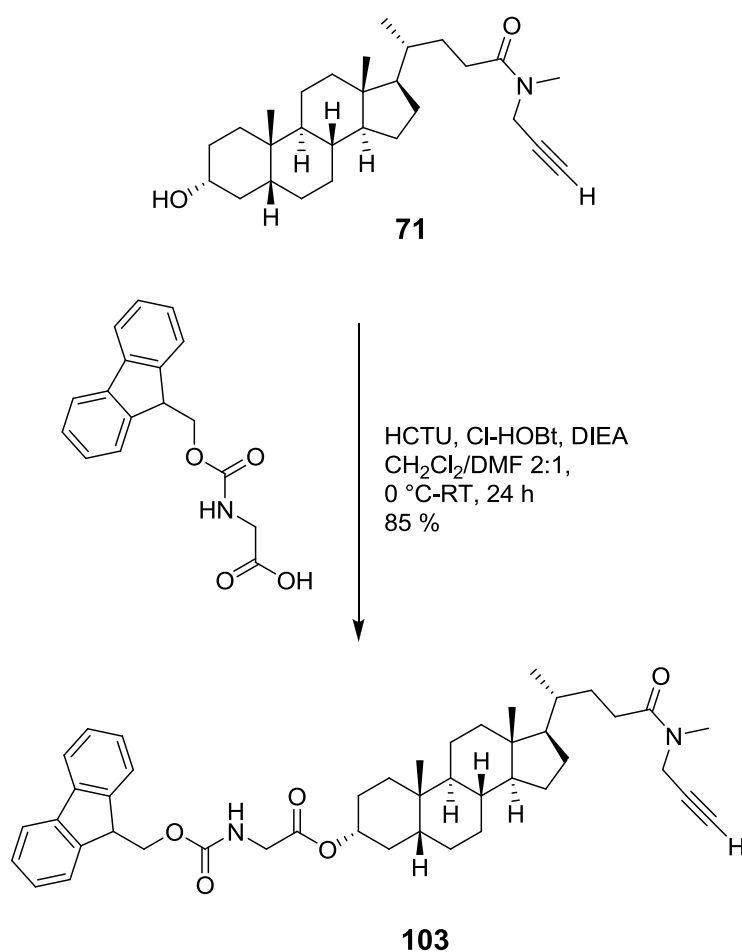


Abbildung 176: Synthese des Fmoc-geschützten Derivats **103**.

einer Testreaktion unter milden Bedingungen mit einer 5 %-igen Lösung von Piperidin in Dichlormethan in akzeptablen Ausbeuten abgespalten. Die Verwendung von höherprozentigen Piperidin-Lösungen führte, unter gleichzeitiger Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe, zur Aminolyse der Esterfunktion. Unter diesen Bedingungen sollte die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe des, mit orthogonalen Schutzgruppen versehenen, heterodimeren Transmembransegments **104**, unter Erhalt aller anderen funktionellen Gruppen, ebenfalls problemlos möglich sein.

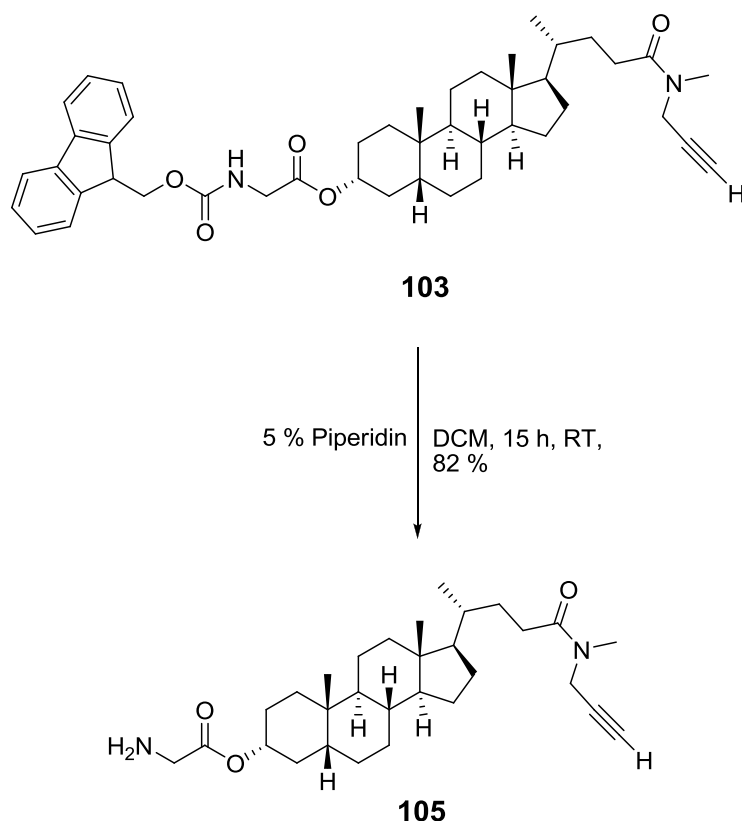


Abbildung 177: Entschützung des Fmoc-geschützten Lithocholsäurederivats **103**.

Über die Dimerisierung der geschützten Glycin-Derivate **72** und **103** und die anschließende Trennung der drei entstanden Dimere, konnte unter Verwendung von zwei Äquivalenten des *N*-Boc-geschützten Bausteins **72**, das orthogonal geschützte Transmembransegment **104** mit einer zufriedenstellenden Ausbeute erhalten werden.

Die Reihenfolge der anstehenden Abspaltung der Schutzgruppen war durch die Anknüpfung *N*-Boc-tryptophan-Einheit vorgegeben, da die Schutzgruppe in der Endverbindung **85** verbleiben sollte. Somit wurde der *N*-Boc-geschützte Glycin-Linker des Transmembransegments **104** unter sauren Bedingungen zum freien Amin entschützt, um in der nächsten Stufe die Kupplung mit dem Tryptophan-Fluorophor zu ermöglichen. Die Peptidkupplung zwischen dem Transmembranbaustein **105** und der Tryptophan-Einheit lieferte nur geringe Ausbeuten des mono-funktionalisierten Lithocholsäure-Dimers **106**, die in diesem Fall nicht auf chromatographische Trennprobleme zurückzuführen sind.

Zur Anknüpfung des Dansylfluorophors wurde der Fmoc-geschützte Transmembranbaustein **106** unter den im Vorfeld ermittelten milden Bedingungen mit 5 %-iger Piperidin-Lösung in das freie Amin **107** überführt. Durch die beträchtlichen Ausbeuteverluste in der vorigen Stufe, wurde in diesem Fall auf eine chromatographische Reinigung verzichtet und das Rohprodukt direkt mit einem Überschuss an Dansylchlorid in Gegenwart von DIEA umgesetzt.

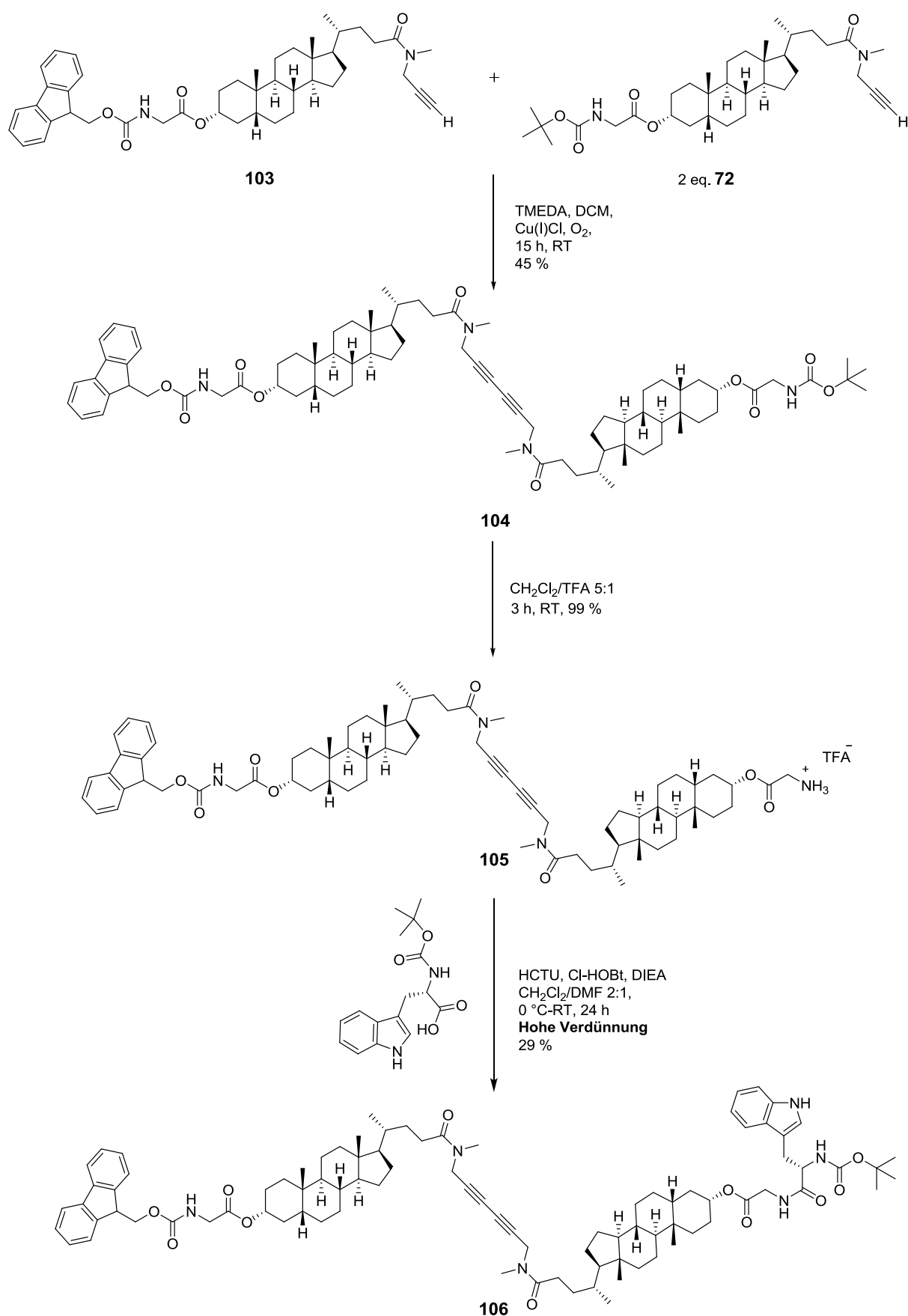


Abbildung 178: Synthese des orthogonal geschützten Gerüstbausteins 104 und anschließende Funktionalisierung mit dem Tryptophan-Fluorophor.

Die bereits bei der Synthese des Rezeptors **67** und der Modellverbindung **100** erfolgreich verwendeten Bedingungen führten in diesem Fall nicht zum Erfolg. Es konnten massenspektrometrisch nur Spuren des Produkts **85** nachgewiesen werden. Die Probleme, die bei der Synthese des heterodimeren Transmembranbausteins **85** mit Tryptophan-Donor-

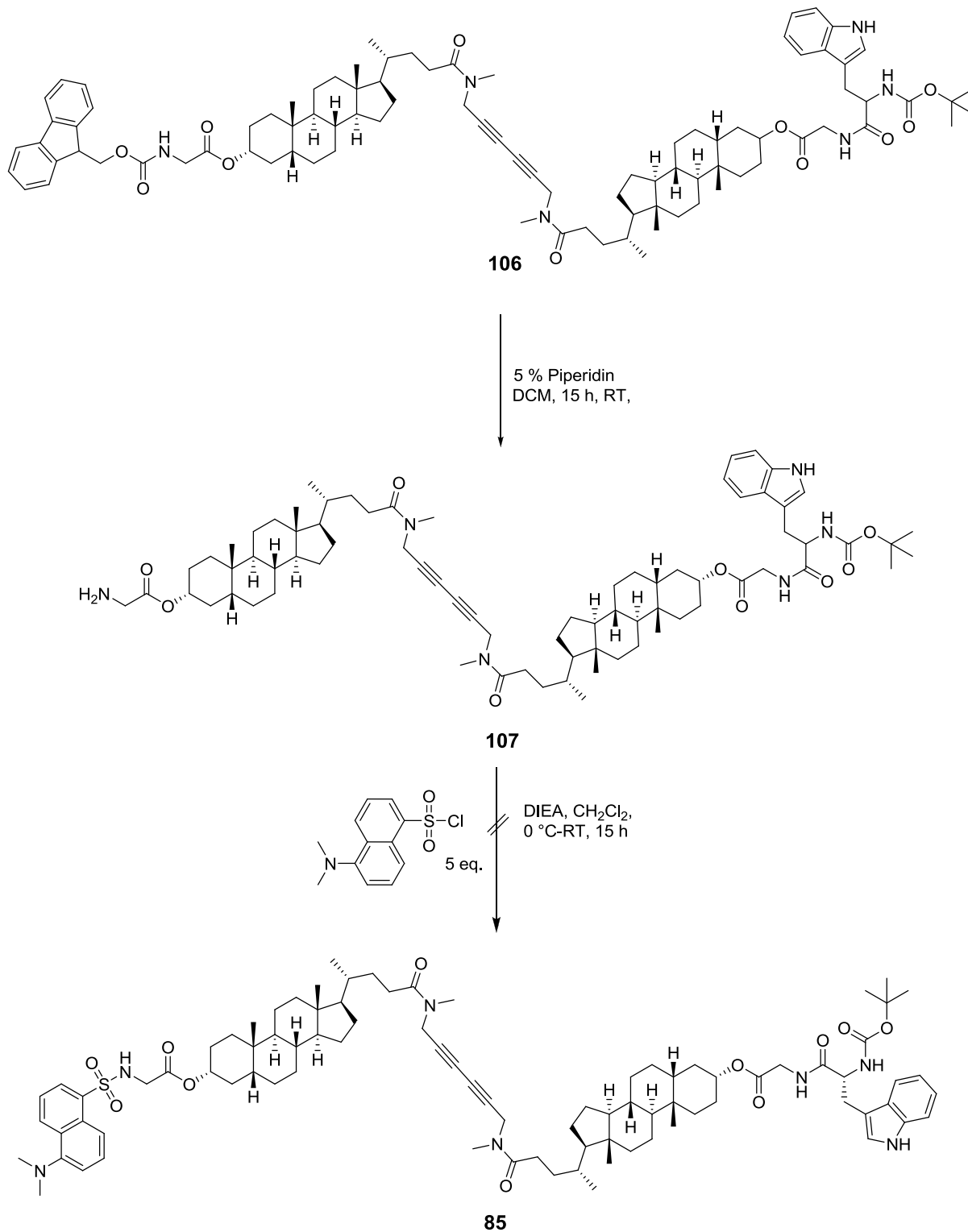


Abbildung 179: Syntheseroute III des unsymmetrischen Bausteins **85**.

und Dansyl-Akzeptorlabel auftraten, waren in im Vorfeld so nicht zu erwarten. Bei der Synthese der Rezeptoren **66** und **67** hatte sich gezeigt, dass die Anknüpfung der Fluorophore ohne weitere Probleme in guten Ausbeuten möglich ist. Bei den durchgeführten Synthesen zeigte sich allerdings, dass die Installation des zweiten Fluorophors, unabhängig davon, welche Reihenfolge gewählt wurde, aus nicht zu klärenden Gründen gehemmt ist. Der sterische Anspruch des dimeren Transmembransegments scheidet aus, da dieser ebenfalls bei der Synthese, der im Vorfeld hergestellten Transmembranbausteine, hätte auftreten müssen. Betrachtet man die vorletzte Stufe jeder der drei Syntheserouten, so lässt sich vermuten, dass das Vorhandensein eines ausgeprägten π -Systems die Anknüpfung eines weiteren Fluorophors verhindert. Die Ausbildung von π -Stapel-Wechselwirkungen zwischen den ausgeprägten aromatischen Systemen könnte eine mögliche Erklärung für den beobachteten Sachverhalt sein. Die zudem aufgetretenen chromatographischen Trennprobleme machten die Synthese der Referenzverbindung **85** unmöglich.

Da sich zu diesem Zeitpunkt der Arbeit trotz intensiver Literaturrecherche und verschiedenster Überlegungen kein alternatives Konzept finden ließ, die Einlagerungsgeometrie der Transmembranrezeptoren **66** und **67** in der Membran nachzuweisen, sollte das vorliegende Konzept durch den Ersatz der Fluorophorkombination überarbeitet und synthetisch zugänglich gemacht werden. Um die vorangehenden synthetischen Erfahrungen möglichst effizient nutzen zu können, sollte beim Austausch des FRET-Paares einer der bekannten Fluorophore beibehalten werden.

Als möglicher FRET-Partner für die natürliche Aminosäure Tryptophan ist die Auswahl an FRET-Partner begrenzt. Der prominenteste Vertreter ist das bereits verwendete Dansyl-Label. Als Alternative kommt die nicht proteinogene Aminosäure Kynurenin **108** in Frage (Abbildung 180), ein Abbauprodukt des Tryptophans in vielen Lebewesen. Diese absorbiert bei einer Wellenlänge von 340 nm und emittiert bei 453 nm. Der Försterradius R_0 beträgt im FRET-Paar mit Tryptophan etwa 39 Å.^[240] Ein Vorteil dieses Systems läge in dem großen Überlappungsintegral $J(1)$ der beiden Fluorophore und dem weniger ausgeprägten aromatischen System. Nachteilig sind allerdings die, im Vergleich zum Dansyl-Label näher beieinander liegenden Emissionsmaxima und der vergrößerte Försterradius R_0 , der zu einem störenden transmembranen FRET über die Doppelmembran führen könnte.

Als alternative FRET-Partner für den Dansylfluorophor steht eine breite Auswahl zur Verfügung. Zum einen Fluorescein- und Rhodamin-Derivate und verschiedene Quencher-Moleküle wie Dabsyl und Dabcyl **104**.^[241] In diesen Konstellationen fungiert der Dansyl-Fluorophor als Donor und die genannten Farbstoffe als FRET-Akzeptoren. Die Fluorescein- und Rhodamin-Derivate scheiden für die Synthese des Referenzbausteins aufgrund der ho-

hen Kosten und der schlechten Anwendbarkeit in organisch-präparativen Synthesen allerdings aus.

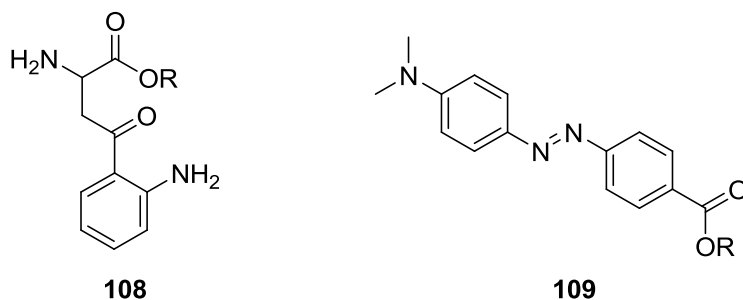


Abbildung 180: Alternative Fluorophore: *links:* Kynurenin 108; *rechts:* Dabcyl 109.

Der Einsatz eines Quenchers anstelle eines fluoreszierenden FRET-Akzeptors bietet den Vorteil, dass keine Hintergrundfluoreszenz auftritt, die entweder von einer direkten Anregung des Akzeptors, wie im Falle der Rezeptoren **66** und **67** beobachtet, oder einer Reemission herrühren kann. Der Fluoreszenz-Quencher Dabcyl **109** (4-((4-(dimethylamino)phenyl)azo)benzoesäure) besitzt ein breites Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 435 nm und keine intrinsische Fluoreszenz (Abbildung 180). In Kombination mit dem Fluoreszenzfarbstoff Dansyl als FRET-Donor besitzt das System einen Försterradius von etwa 30 Å und verfügt über ein großes Überlappungsintegral $J(1)$.^[242] Aufgrund der kommerziellen Verfügbarkeit des Dabcyl-*N*-Succinimid-Aktivesters und dem Vorteil, eine direkte Anregung des Fluoreszenzakzeptors durch Verwendung des Quencher-moleküls auszuschließen, haben wir uns für das FRET-Paar Dansyl und Dabcyl entschieden. Nach dem Vorbild der vorangegangenen Synthesen sollte im Folgenden der heterodimere Transmembranbaustein **110** mit dem vorgestellten FRET-Paar aus Dansyl-Donor und Dabcyl-Quencher synthetisiert werden (Abbildung 181).

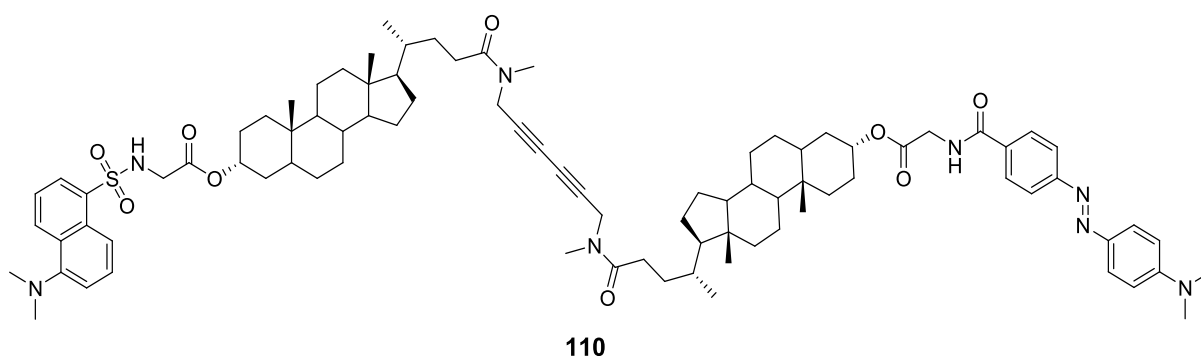


Abbildung 181: Heterodimerer Transmembranbaustein 110 mit Donor-Quencher-Kombination.

3.4.8.2 Synthese des heterodimeren Transmembranbausteins 110

Die Synthese des modifizierten Hetero-Dimers **110** sollte in Anlehnung an die erste Syntheseroute von *L. Bartsch* durch die Kupplung der halben funktionalisierten Transmembransegmente **100** und **111** erfolgen, um die Zielverbindung **110** über möglichst wenige Stufen zu erhalten.

Das Transmembransegment **100** mit Dansyl-Donor-Funktionalität war bereits erfolgreich synthetisiert worden. Zur Anknüpfung der Quencher-Einheit wurde der kommerziell erhältliche Dabcyl-*N*-Succinimid-Aktivester mit dem entschützten Gerüstbaustein **73** unter Zusatz eines Überschusses von DIEA als Hilfsbase umgesetzt. Nach wässriger Aufarbeitung

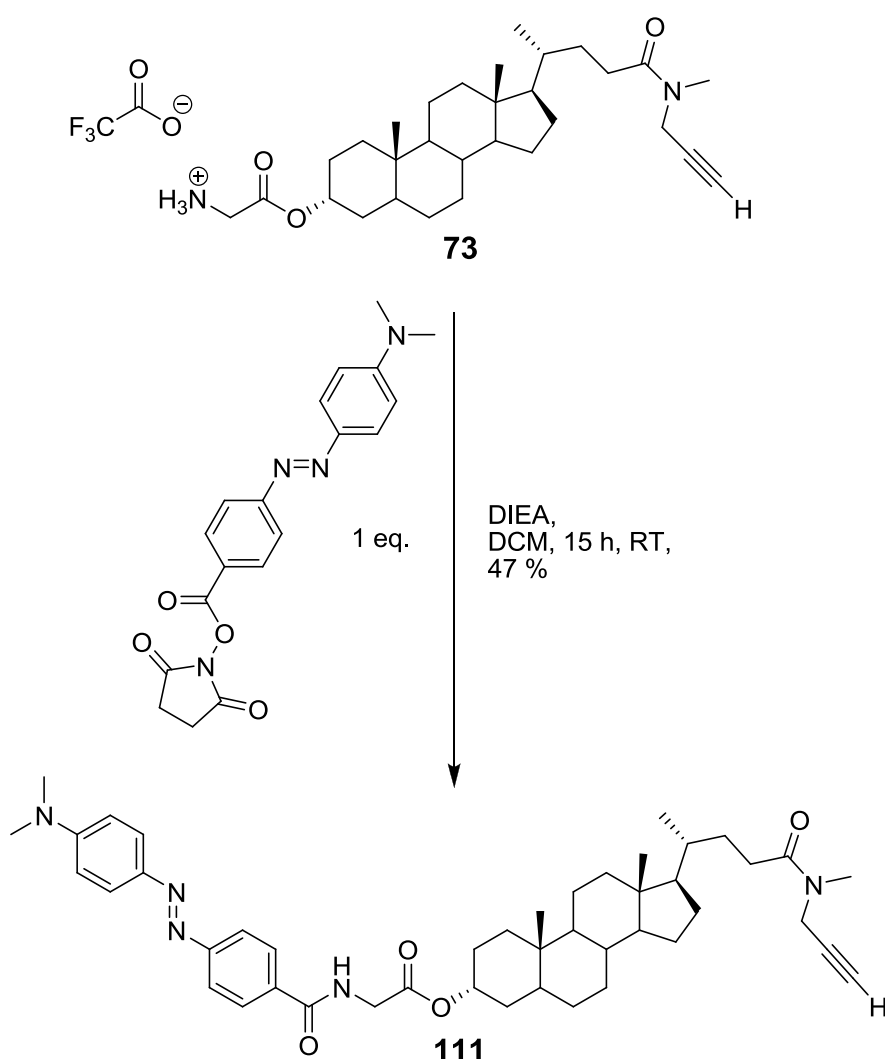


Abbildung 182: Synthese des Transmembransegments **111** mit Dabcyl-Quencher-Einheit.

und zweimaliger säulenchromatographischer Reinigung konnte das Transmembransegment **111** mit einer Ausbeute von 47 % in reiner Form isoliert werden. Die nachfolgende Glaser-Kupplung wurde unter Standardbedingungen durchgeführt. In diesem Fall wurden beide die Transmembransegmente **100** und **111** in einem Verhältnis von 1:1 umgesetzt. Erwar-

tungsgemäß verlief die Reaktion vollständig unter der Bildung der drei statistischen Kuppelungsprodukte. Die dünnschichtchromatographische Trennung zeigte, unter Verwendung verschiedener Laufmittelgemische, abermals geringe Polaritätsunterschiede der drei Dime-

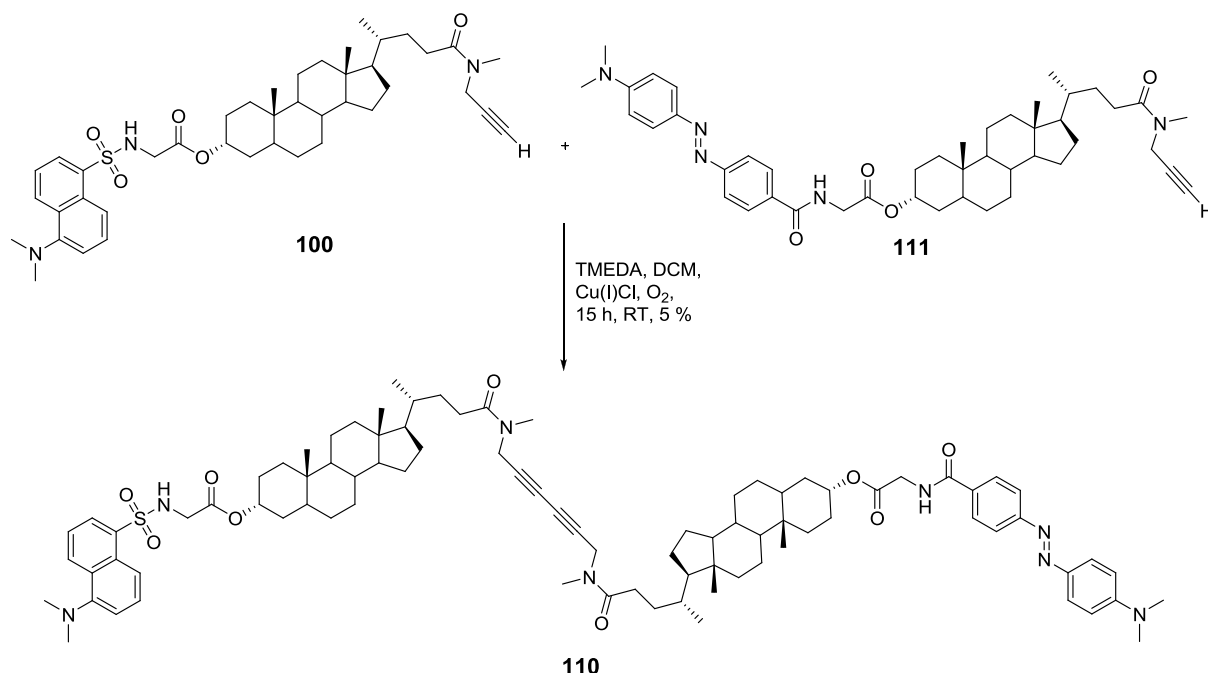


Abbildung 183: Synthese des heterodimeren Transmembranbausteins **110** mit Donor- und Quencher-Einheit.

re. Die Zielverbindung konnte durch mehrmalige Aufreinigung immerhin mit einer Ausbeute von 5 % in sauberer Form isoliert werden. Da für die anstehenden Messungen nur geringe Mengen der Verbindung **110** benötigt werden, war dies akzeptabel.

Abbildung 184 zeigt das ¹H-NMR-Spektrum der Zielverbindung **110**. Die Vielzahl an aromatischen Protonensignalen lässt sich mit Hilfe der ¹H-NMR-Spektren der Transmembransegmente **100** und **111** eindeutig zuordnen. Die charakteristischen Signale des Steroidgerüsts, sowie der Glycin-Linker lassen sich ebenfalls zuordnen. Ähnlich wie die *N*-Methylgruppe des Propargylamids liegt auch die Dimethylaminogruppe der Dabcyl-Einheit **110** im Lösungsmittel Chloroform in zwei mesomeren Grenzformen vor. Die Methylprotonen sind nicht in Form eines Singulets mit dem Integral sechs im ¹H-NMR-Spektrum vorhanden, sondern zeigen zwei Singulets mit dem Integralverhältnis 4:2. Somit liegen die zwei Grenzformen zwischen Dimethylamino- und Dimethylammonium-Gruppe in einem Verhältnis von 2:1 vor.

Mit der zweifach fluoreszenzgelabelten Verbindung **110** wurden im Anschluss Messungen zur Bestimmung der Einlagerungsgeometrie durchgeführt.

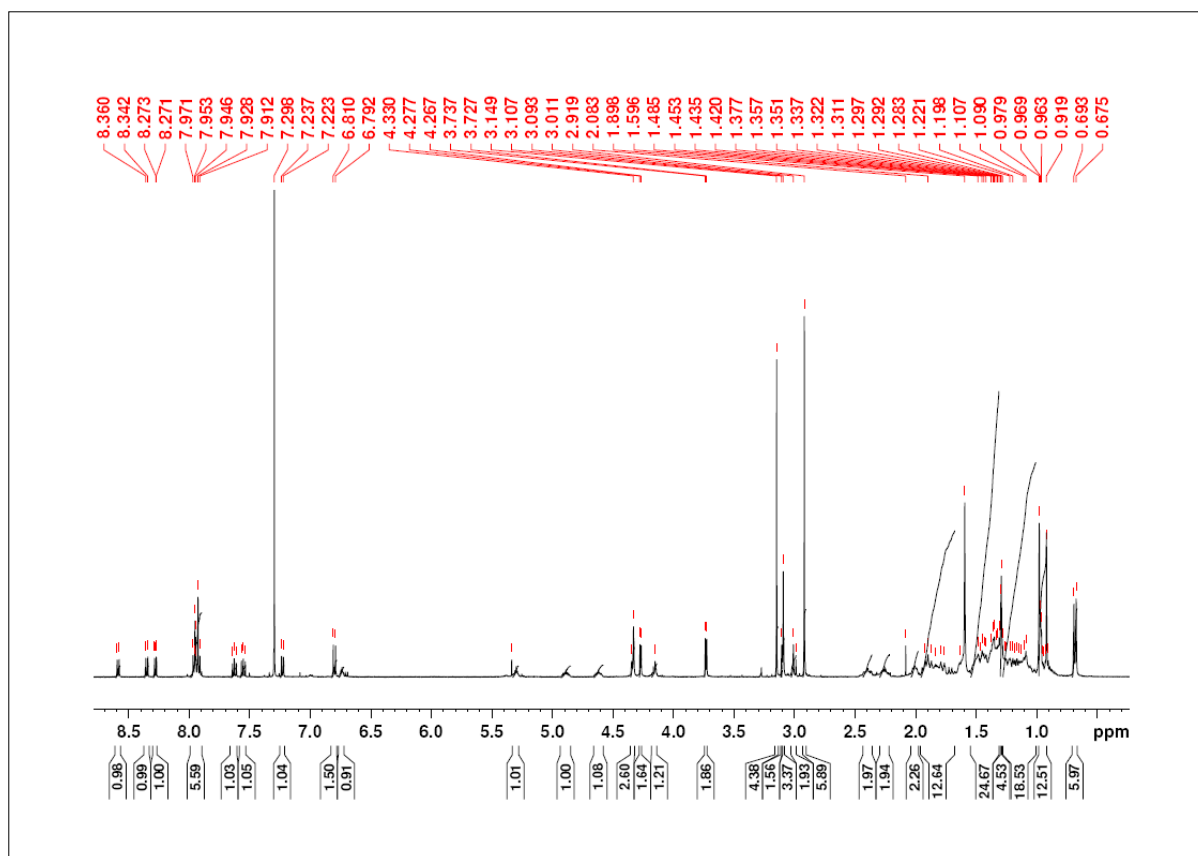


Abbildung 184: ^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3): Dabcyl-(N-glycyl-lithocholsäure-N-methylpropargylamid-Dimer)-Dansyl 110.

3.4.8.3 Experimente mit dem unsymmetrischen Transmembranbaustein 110

Der zweifach fluoreszenzgelabelte Transmembranbaustein **110** wurde in steigenden Konzentrationen (0.25 % - 5.0 %) in Liposomen, bestehend aus DMPC/DPPC = 75 %/25 % eingelagert. Die Präparation der Liposomen erfolgte nach dem etablierten Verfahren (3.3.3.2). Für die jeweiligen Dotierungen wurden die Emissionsspektren bei einer Anregungswellenlänge von 330 nm bestimmt.

Für den Fall einer gestreckten Einlagerung des Transmembranbausteins **110** ist bei höheren Konzentrationen ein konzentrationsabhängiges Quenchen der Dansyl-Donor-Emission zu erwarten, da eine Konzentrationserhöhung des Bausteins **110** zu einem verringerten räumlichen Abstand zwischen den Fluorophoren auf einer Seite der Membran führt (Abbildung 185 links). Für den zweiten denkbaren Fall, der „U-förmigen“ Einlagerung des Transmembransegments **110**, sollte, bereits bei sehr geringen Dotierungen der Doppelmembran, ein konzentrationsunabhängiges Quenchen der Dansyl-Fluoreszenz zu beobachten sein, da sich die beiden Fluorophore eines Transmembranbausteins auf einem konstanten räumlichen Abstand auf einer Seite der Doppelmembran befinden (Abbildung 185 rechts).

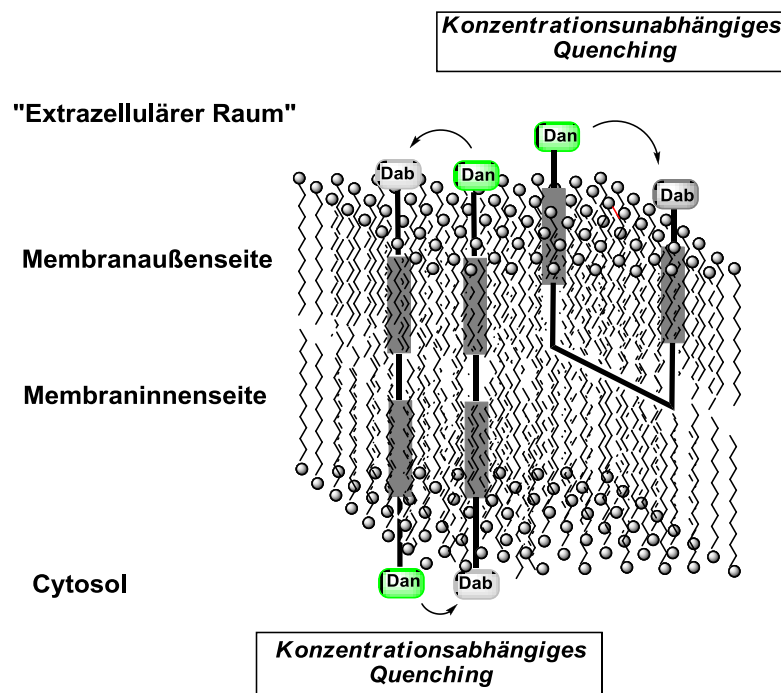


Abbildung 185: links: konzentrationsabhängiges Quenching bei gestreckter Einlagerung des Rezeptors 110; rechts: konzentrationsunabhängiges Quenching bei „U-förmiger“-Einlagerung des Rezeptors 110.

Die Emissionsspektren für die untersuchten Liposomen sind in Abbildung 186 dargestellt. Die Auswertung der Emissionsspektren zeigt einen Sachverhalt, der in einem direkten Gegensatz zu den gemachten Überlegungen steht. Mit steigender Konzentration des Bausteins **110** nimmt die Intensität I der Dansylemission sukzessive zu. Interessant ist, dass diese Beobachtung mit beiden Einlagerungsgeometrien und der damit verbundenen Veränderung der Emissionsspektren nicht in Einklang zu bringen ist. Für die gestreckte Einlagerung kann ausschließlich eine stetige Abnahme der Fluoreszenzintensitäten erwartet werden. Als Referenz

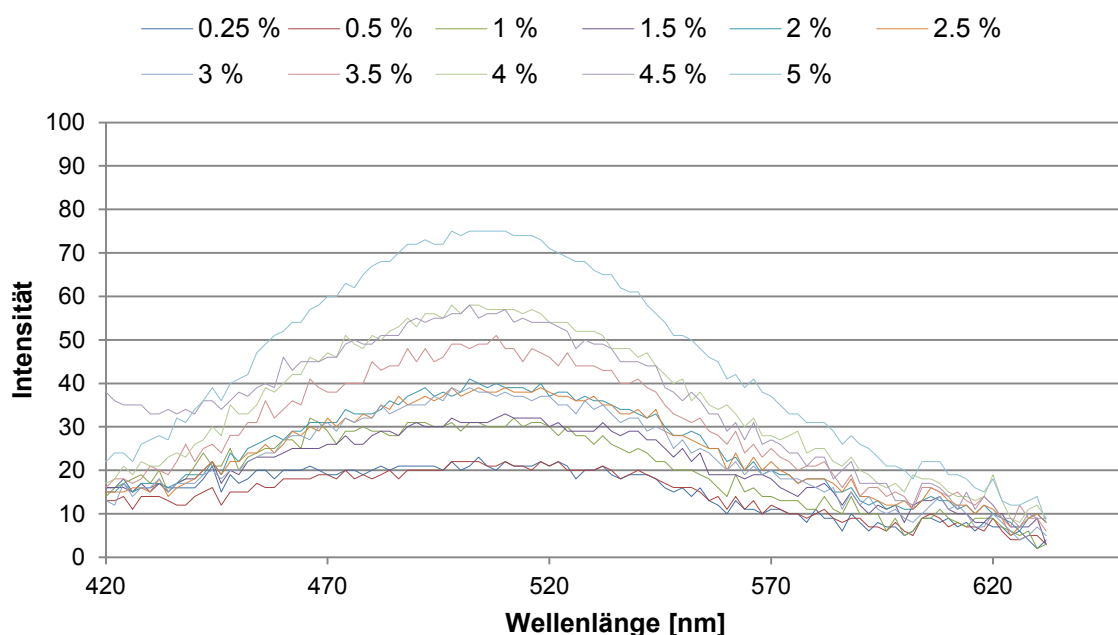


Abbildung 186: Einlagerung des Transmembranbausteins 110 (0.25 % - 5.0 %) in DPPC/DMPC = 75 % - 10 %.

renz kann hierfür die Erhöhung des permanenten FRET-Effekts herangezogen werden, der bei den Experimenten mit den Rezeptoren **66** und **67** im Zuge einer höheren Dotierung mit den Rezeptoren **66** und **67** beobachtet werden konnte (vgl. 3.4.10). Des Weiteren widersprechen die Beobachtungen den Überlegungen, die auf eine „U-förmige“ Einlagerung hindeuten. Zwar ist bei niedrigen Dotierungen bereits eine deutliche Löschung der Dansylfluoreszenz zu erwarten, allerdings sollte diese, durch das, bei höheren Dotierungen immer mehr in den Vordergrund tretende konzentrationsabhängige Quenchen deutlich verstärkt werden. Diese Verstärkung der Fluoreszenzlöschung kann, wie beschrieben, nicht beobachtet werden. Vergleicht man zudem die Fluoreszenzintensitäten I der Dansylemission des Transmembranbausteins **110**, mit denen des Rezeptors **67** bei identischen Dotierungen der Doppelmembran, so fällt auf, dass für den Fall des Quencher-funktionalisierten Bausteins **110** die Intensität um den Faktor 20 niedriger ist, als für den Rezeptor **67** (vgl. 3.4.3). Die drastisch erniedrigten Fluoreszenzintensitäten I ließen sich mit einer geringen Einlagerung der Verbindung **110** in die Doppelmembran erklären. Allerdings konnte während der Liposomenpräparation keine Ausfällung des Rezeptors **110** beobachtet werden. Eine mögliche Ursache für die geringe Fluoreszenz des Bausteins **110** in den Liposomen könnte durch die Ausbildung von Molekül-Clustern herrühren. Zum einen fehlen dem Baustein **110** zwei negative Ladungen der Bisphosphonat-Pinzette, die attraktiven hydrophoben Wechselwirkungen des Transmembrangerüsts entgegenwirken können, zum anderen sollten die beiden terminalen aromatischen Systeme zu π -Stapel-Wechselwirkungen untereinander befähigt sein.

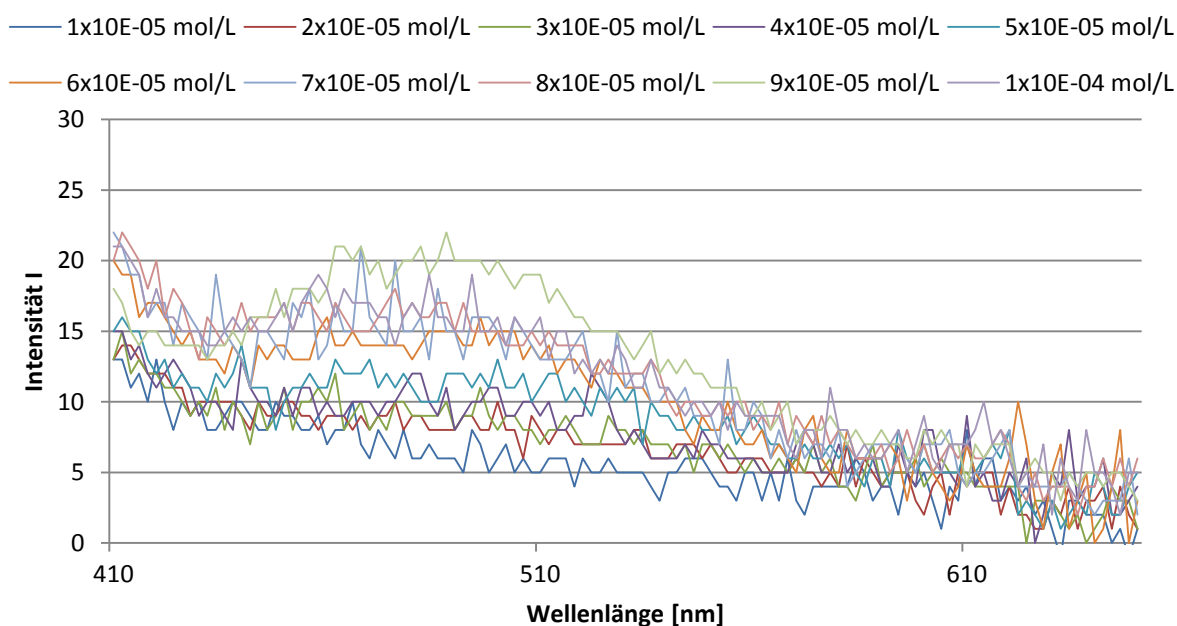


Abbildung 187: Emissionsspektren von **110** ($c = 10^{-5}$ mol/L - 10^{-4} mol/L) in MeOH ($\lambda_{\text{Ex}} = 330$ nm).

Um diese Vermutung zu untersuchen, wurde der Transmembranbaustein **110** in entsprechenden Konzentrationen in Methanol gelöst und die Emissionsspektren bei einer Anregungswellenlänge von 330 nm bestimmt. Bei starken hydrophoben, bzw. π - π -Wechselwirkungen der Rezeptormoleküle untereinander, sollten ähnlich stark erniedrigte Fluoreszenzintensitäten auch in freier Lösung zu beobachten sein. Die in Abbildung 187 abgebildeten Emissionsspektren von **110** in Methanol bestätigen diese Vermutung. Die Fluoreszenzintensitäten in freier Lösung liegen sogar noch unter denen, die für die Einlagerung in Liposomen bestimmt werden konnten. Um auch hier eine Ausfällung des Bausteins **110** vollständig ausschließen zu können wurden ebenfalls die Absorptionsspektren für die entsprechenden Konzentrationen in methanolischer Lösung bestimmt. Hierbei können die Absorptionsmaxima beider Fluorophore simultan bestimmt werden. Abbildung 188 zeigt die konzentrationsabhängige Absorption des Transmembranbausteins **110**. Betrachtet man die Absorptionsmaxima, so ist zu erkennen, dass keine Ausfällung des Bausteins **110** aus der Lösung stattgefunden hat.

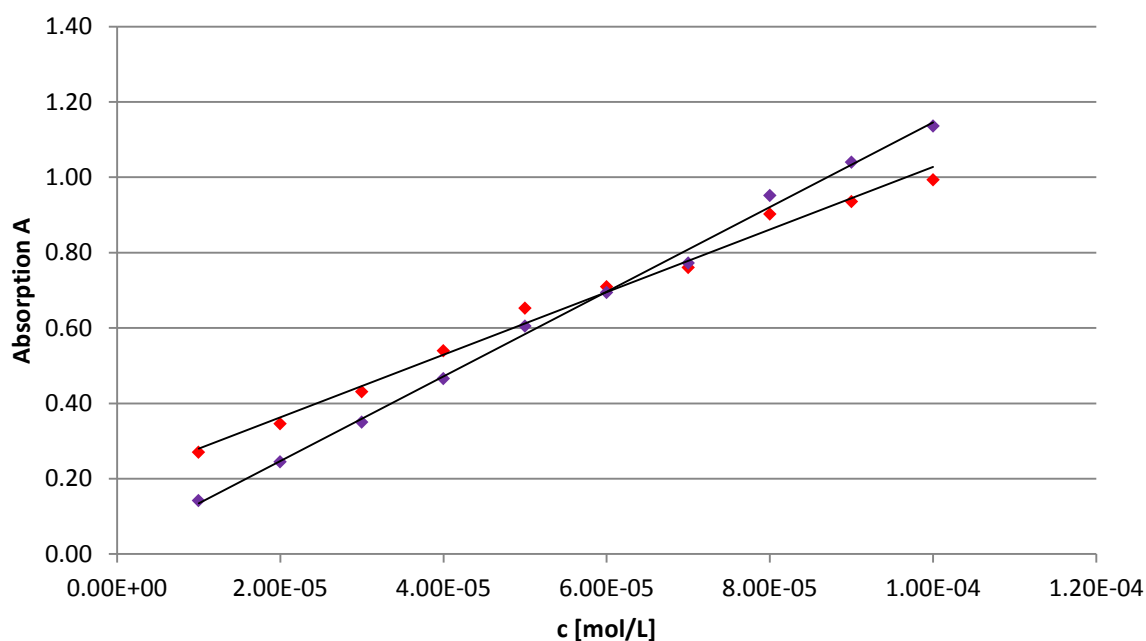


Abbildung 188: Absorption der Fluorophore des Transmembranbausteins **110** in MeOH; rot: Dansylkomponente; violett: Dabcylkomponente.

Zusammenfassend konnten mit Hilfe des Transmembranbausteins **110** keine Erkenntnisse bezüglich der Einlagerungsgeometrie der Rezeptoren **66** und **67** erhalten werden. Nach erfolgreicher Synthese konnte der Baustein **110** ebenfalls erfolgreich in Liposomen eingelagert werden, doch führen starke hydrophobe, bzw. π - π -Wechselwirkungen vermutlich zur Bildung von Clustern des Rezeptors **110** in der Lipiddoppelschicht, so dass eine erfolgreiche Unterscheidung der beiden postulierten Fälle bezüglich der Einlagerungsgeometrie nicht getroffen werden konnte.

3.4.8.4 Experimente mit den Rezeptoren 66 und 67 und Eosin Y 112 als Fluoreszenzsonde

Eine weitere etablierte Methode zur Strukturaufklärung ist die Verwendung von Multi-FRET-Systemen. Neben natürlich vorkommenden Systemen, wie z.B. den Lichtsammelkomplexen der Phycobilisomen, die ein Multi-FRET-System bestehend aus R-Phycoerythrin, C-Phycocyanin und Allophycocyanin enthalten, um Licht zwischen den verschiedenen Photosystemen zu transferieren, werden künstliche Multi-FRET-Systeme vor allem in der DNA-Chemie und deren Strukturaufklärung eingesetzt. Hierbei nutzt man an definierten Stellen mit der DNA verknüpfte Fluorophore, um biologische Strukturen aufzuklären.^[243-249]

Um diese Methode zur Aufklärung der Einlagerungsgeometrie der Rezeptoren **66** und **67** in der Lipiddoppelmembran nutzbar zu machen, müssen die bekannten experimentellen Rahmenbedingungen entsprechend angepasst werden. Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Durchführung der Experimente ist es, einen geeigneten dritten Fluorophor in das System zu integrieren, der ein weiteres FRET-Paar mit dem bisher eingesetzten Dansyl-Fluoreszenz-Akzeptor **67** bildet. Hierfür kommen z.B. der bereits zuvor eingesetzte Quencher Dabcyl **109**, Fluorecein oder Eosin Y **112** in Frage. Die Verwendung des Fluoreszenz-Löschers **109** hätte allerdings den Nachteil, dass kein weiteres Emissionsmaximum zu genaueren Betrachtung der Vorgänge während der Signaltransduktionsexperimente zur Verfügung steht. Zudem soll der eingesetzte Fluorophor wasserlöslich sein, da vorgesehen ist, den Fluorophor nicht kovalent verknüpft, sondern als externe Sonde im wässrigen Medium einzusetzen und zum einen die Lage der Dansylfunktion und die, bei Zugabe des Botenstoffs DET auftretende Änderung der Fluoreszenzintensität des Fluoreszenzakzeptors detektieren und detailliert analysieren zu können.

Literaturbekannt ist die Kombination aus Dansyl und Eosin Y **112** als FRET-Paar. Vögtle *et al.* verwendeten ein mit 32 Dansyl-Einheiten gelabeltes Dendrimer zur Extraktion von freiem Eosin Y **112** aus wässriger Lösung. Die Verkapselung des Gastes im Dendrimer konnte direkt durch den Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer der Dansyl-Einheiten auf den inkludierten Gast ermittelt werden.^[250] Der Energie-Transfer zwischen diesen beiden Fluorophoren ist sehr empfindlich, da eine große Überlappung zwischen dem Dansyl-Emissionsspektrum ($\lambda_{\text{Max}} = 520 \text{ nm}$) und dem Eosin-Absorptionsspektrum ($\lambda_{\text{Max}} = 520 \text{ nm}$) vorliegt.

Für die Verwendung von Eosin Y **112** als extern (inneres oder äußeres wässriges Medium) zugesetzter Fluoreszenzsonde lassen sich in Kombination mit dem System, bestehend

aus den Rezeptoren **66** und **67** in DMPC/DPPC = 75 % : 25 %, vier denkbare Konstellationen eines zu erwartenden Multi-FRET-System bezüglich der möglichen Einlagerungsgeometrie der Rezeptoren **66** und **67** formulieren:

1. Multi-FRET-System bei externer Zugabe von Eosin Y **112** und gestreckter Einlagerung der Transmembranbausteine **66** und **67**

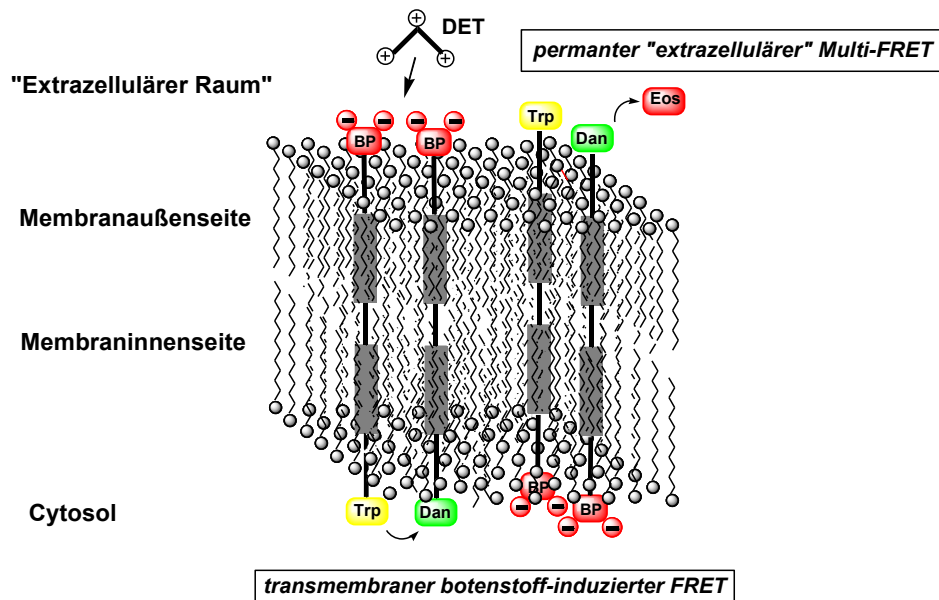


Abbildung 189: Signaltransduktion mit Eosin Y **112** als externer Fluoreszenzsonde (gestreckte Einlagerung).

Für den Fall einer gestreckten Einlagerung der Rezeptoren **66** und **67** und der Zugabe von Eosin Y **112** in das extrazelluläre wässrige Medium, ist bei einer ausreichend großen Konzentration von Eosin Y **112**, ein permanenter Energietransfer zwischen den extrazellulären Dansyl-Gruppen und Eosin Y **112** zu erwarten, der im Vergleich zum eigentlichen Signaltransduktionsexperiment zu einer verringerten Dansylemission bei 510 nm und einer gesteigerten Eosin-Emission bei 560 nm führt (Abbildung 189 rechts). Hierbei kann der permanente Energie-Transfer zwischen dem Fluoreszenz-Donor **66** und dem Fluoreszenz-Akzeptor **67** genutzt werden, um eine indirekte Anregung der Dansylemission bei einer niedrigen Wellenlänge von 280 nm (Absorptionsmaximum von **66**) zu erreichen. Die Zugabe des Botenstoffs DET, zu diesem System konstanter Fluoreszenz-Intensitäten, sollte zu der bekannten Chelatisierung der extrazellulären Bisphosphonat-Einheiten führen und den Energie-Transfer zwischen **66** und **67** auf der intrazellulären Seite der Membran induzieren. Diese zusätzliche Anregung der Dansylemission führt in diesem Fall nicht zu einer weiteren Energie-Übertragung auf das externe Eosin Y **112** (Abbildung 189 links). Somit sind bei einer gestreckten Einlagerung der Rezeptoren **66** und **67** nach Zugabe des Botenstoffs DET eine Abnahme der Tryptophan-Emission (330 nm), eine Zunahme der Dansylemission (510 nm) und eine unveränderte Eosin Y-Emission (560 nm) zu erwarten.

2. Multi-FRET-System bei externer Zugabe von Eosin Y **112** und „U-förmiger“ Einlagerung der Transmembranbausteine **66** und **67**

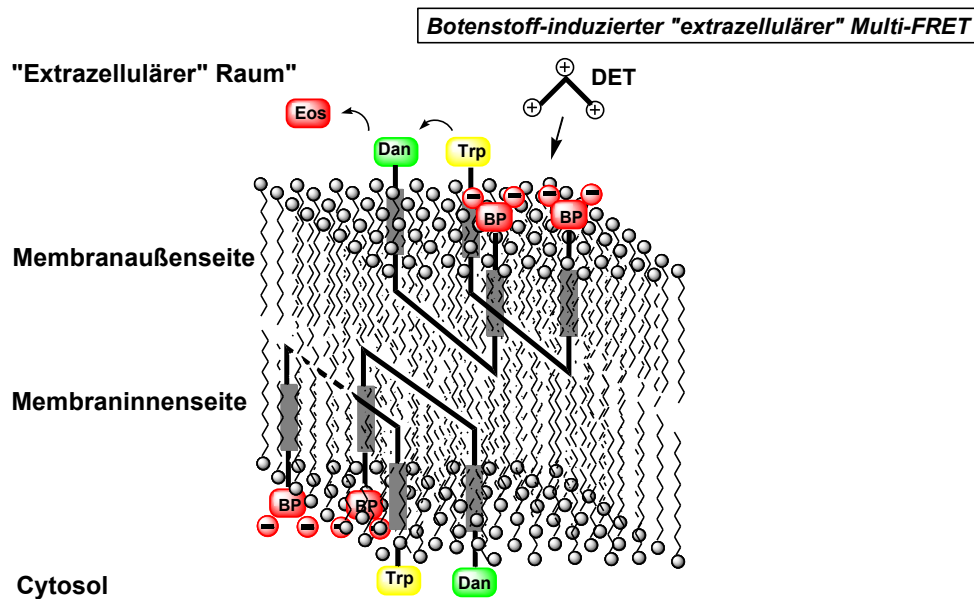


Abbildung 190: Signaltransduktion mit Eosin 112 als externer Fluoreszenzsonde ("U-förmige Einlagerung").

Für den Fall einer „U-förmigen“ Einlagerung der Rezeptoren **66** und **67** und der Zugabe von Eosin Y **112** in das extrazelluläre wässrige Medium, ist bei einer ausreichend großen Konzentration von Eosin Y **112**, ein permanenter Energietransfer zwischen den extrazellulären Dansyl-Gruppen und Eosin Y **112**, wie im zuvor beschriebenen Fall, zu erwarten, der im Vergleich zum eigentlichen Signaltransduktionsexperiment, zu einer verringerten Dansylemission bei 510 nm und einer gesteigerten Eosin-Emission bei 560 nm führt (Abbildung 190 rechts). Die Zugabe des Botenstoffs DET zu diesem System sollte ebenfalls einen Energie-Transfer zwischen **66** und **67** induzieren, der allerdings auf die Verringerung des räumlichen Abstands der Fluorophore **66** und **67** auf der Außenseite der Membran zurückzuführen ist. Diese zusätzliche Anregung der Dansylemission führt in diesem Fall zu einer weiteren Energie-Übertragung auf das externe Eosin Y **112** (Abbildung 190 rechts). Somit sind bei einer „U-förmigen“ Einlagerung der Rezeptoren **66** und **67** nach Zugabe des Botenstoffs DET eine Abnahme der Tryptophan-Emission (330 nm), eine Abnahme der Dansylemission (510 nm) und eine Zunahme der Eosin Y-Emission (560 nm) zu erwarten.

3. Multi-FRET-System bei inkludiertem Eosin Y **112** und gestreckter Einlagerung der Transmembranbausteine **66** und **67**

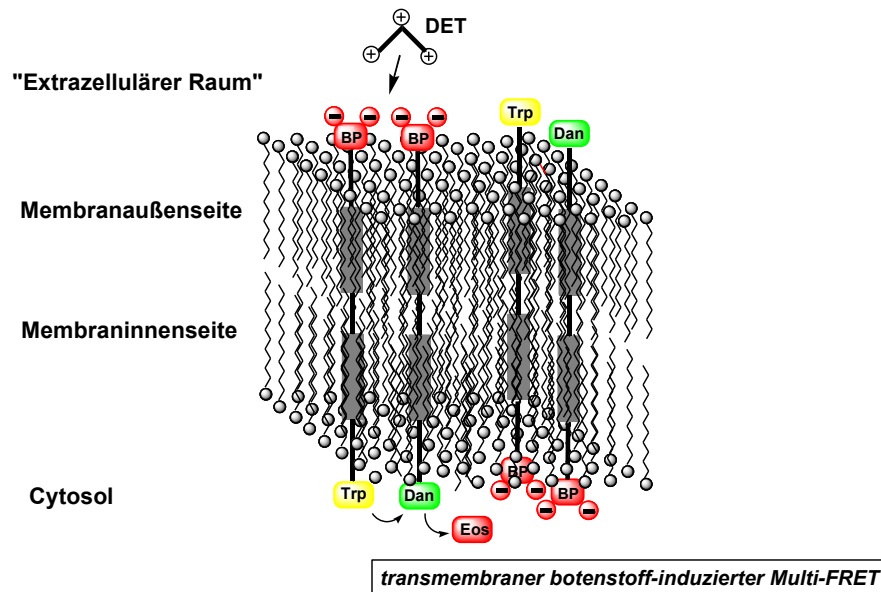


Abbildung 191: Signaltransduktion mit Eosin 112 als inkludierter Fluoreszenzsonde ("Stabchen-Form").

Bei der Einlagerung der Fluoreszenzsonde Eosin Y **112** in das innere wässrige Medium des Liposoms ergibt sich für den Fall der gestreckten Einlagerung der Rezeptoren **66** und **67** ein permanenter Energie-Transfer zwischen den Dansyl-Einheiten auf der Innenseite der Membran und Eosin Y **112** (Abbildung 191 links). Die Zugabe des primären Botenstoffs induziert auch in dieser Konstellation ein induziertes Multi-FRET-System. Somit sind bei einer gestreckten Einlagerung der Rezeptoren **66** und **67** nach Zugabe des Botenstoffs DET eine Abnahme der Tryptophan-Emission (330 nm), eine Abnahme der Dansylemission (510 nm) und eine Zunahme der Eosin Y-Emission (560 nm), in Analogie zum zuvor beschriebenen Fall zu erwarten.

4. Multi-FRET-System bei inkludiertem Eosin Y **112** und „U-förmiger“ Einlagerung der Transmembranbausteine **66** und **67**

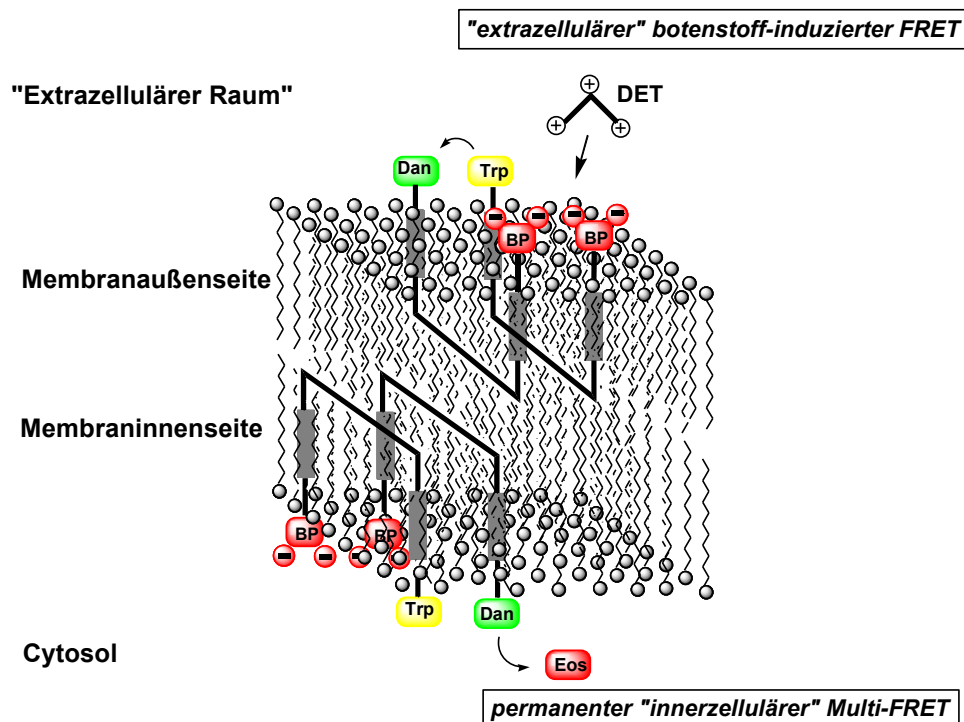


Abbildung 192: Signaltransduktion mit Eosin 112 als inkludierter Fluoreszenzsonde ("U-Form").

Im vierten möglichen Fall kommt es bei der Einlagerung der Fluoreszenzsonde Eosin Y **112** in das innere wässrige Medium des Liposoms und einer „U-förmigen“ Einlagerung der Rezeptoren **66** und **67** ebenfalls zu einem permanenten Energie-Transfer zwischen den Dansyl-Einheiten auf der Innenseite der Membran und Eosin Y **112** (Abbildung 192 links). Die Zugabe des Botenstoffs DET sollte zu einem Energie-Transfer zwischen **66** und **67** auf der extrazellulären Seite der Membran führen. Diese zusätzliche Anregung der Dansylemission führt in auch diesem Fall nicht zu einer weiteren Energie-Übertragung auf das externe Eosin Y **112** (Abbildung 192 rechts). Somit sind bei einer „U-förmigen“ Einlagerung der Rezeptoren **66** und **67** nach Zugabe des Botenstoffs DET eine Abnahme der Tryptophan-Emission (330 nm), eine Zunahme der Dansylemission (510 nm) und eine unveränderte Eosin Y-Emission (560 nm) zu erwarten.

3.4.8.4.1 Experimente mit extrazellulär zugesetztem Eosin Y **112** und den Rezeptoren **66** und **67**

Um den experimentellen Aufwand in den ersten Messungen möglichst gering zu halten und eine Aussage über die allgemeine Anwendbarkeit dieser Methode treffen zu können, sollte in den Signaltransduktionsexperimenten die Fluoreszenzsonde Eosin Y **112** in das äußere wässrige Medium gegeben werden. Bei der Einlagerung von **112** in das Innere der Liposomen, müssten diese zuerst in einem zusätzlichen Reinigungsschritt mittels einer Sephadex-Säule von nicht eingeschlossenem Eosin Y **112** gereinigt werden.

Vorab wurden die Rezeptoren **66** und **67** einzeln in Liposomen eingelagert und mit der Fluoreszenzsonde **112** versetzt, um zum einen ein produktives FRET-System zwischen **67** und **112** nachzuweisen und eine mögliche störende Wechselwirkung zwischen **66** und **112** ausschließen zu können. Hierzu wurden Liposomen mit einer Dotierung von 2.5 % **66** bzw. **67** präpariert und mit 0.0 – 1.0 eq. Eosin Y **112** versetzt. Abbildung 193 zeigt die Emissionsspektren **67**-dotierter Liposomen nach Titration mit der Sonde **112**.

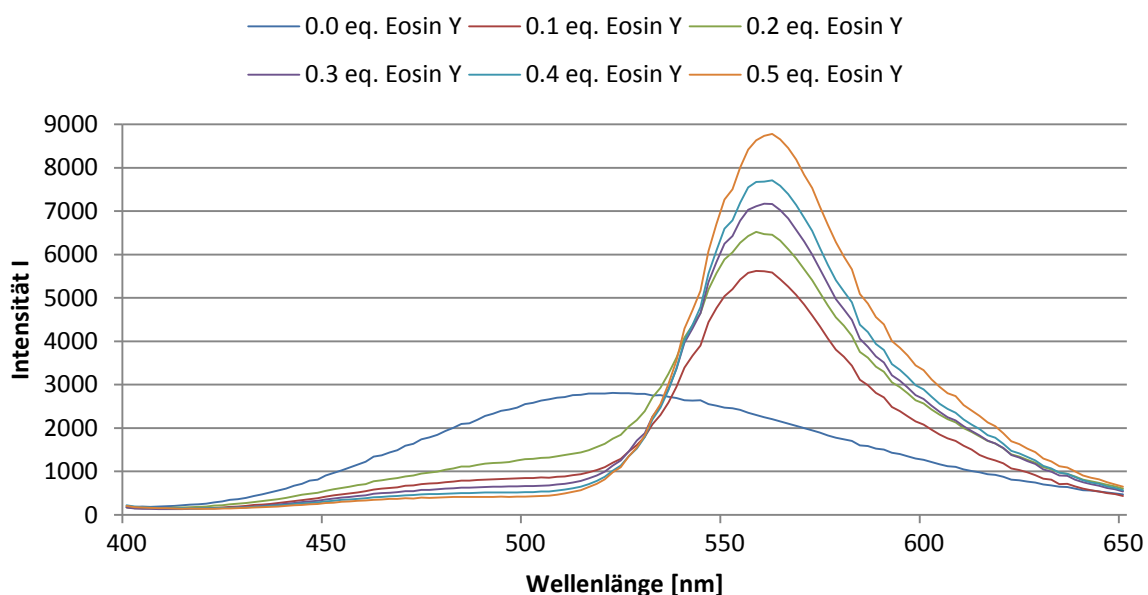


Abbildung 193: Fluoreszenzspektren von Rezeptor **67** in 90 % DMPC - 10 % DPPC in Gegenwart von 0.0 eq. - 0.5 eq. Eosin Y **112** ($\lambda_{EX} = 330$ nm).

Es zeigte sich, dass bereits geringe Zusätze (0.1 eq bezogen auf **67**) an Eosin Y **112** zu der Liposomenlösung, zu einem starken Energie-Transfer zwischen den Fluorophoren führen. Die Zugabe weitere Äquivalente **112** führt zu einem sukzessiv gesteigerten Energieübertrag vom Donor **67** auf den Akzeptor **112**. Somit konnte in einem ersten Experiment die allgemeine Anwendbarkeit bestätigt werden. Im zweiten Referenzexperiment wurden **66**-dotierte Liposomen ebenfalls mit Eosin Y **112** titriert. Hier zeigte sich, dass die Zugabe von **112** ebenfalls zu einem Quenchen der Tryptophanemission führt. Allerdings führt erst die

Zugabe von 0.3 – 1.0 eq. zu einem deutlich gesteigerten Löschen der Fluoreszenz. Da im ersten Experiment mit **67**-dotierten Liposomen bereits der Zusatz von 0.1 eq **112** einen ausgeprägten Energie-Transfer zur Folge hatte, sollte für die Signaltransduktionsexperimente eine

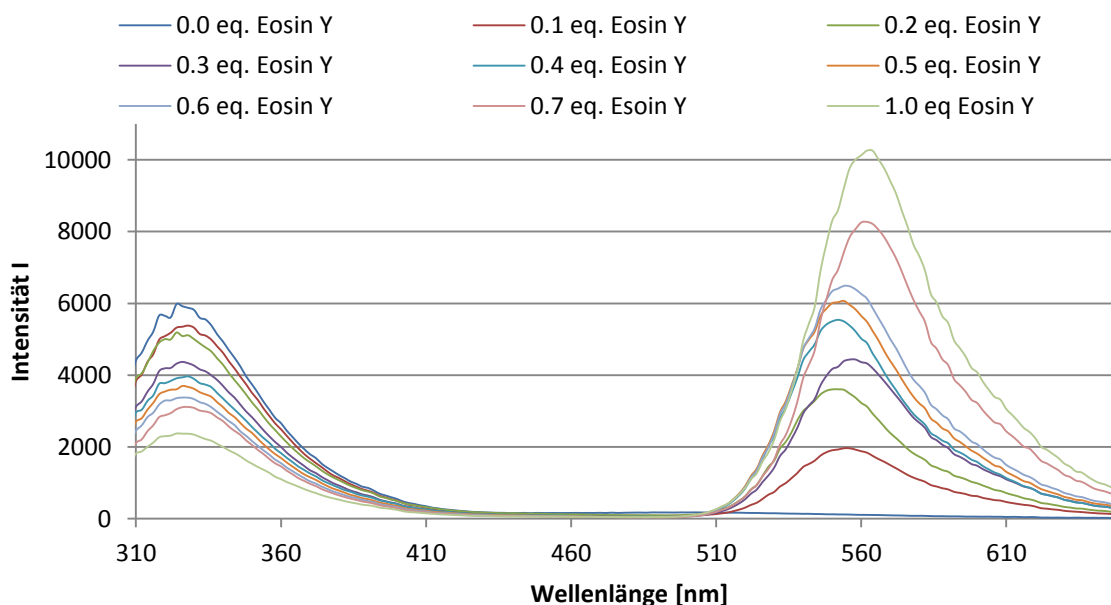


Abbildung 194: Fluoreszenzspektren von Rezeptor 66 in 90 % DMPC - 10 % DPPC in Gegenwart von 0.0 eq. - 1.0 eq Eosin Y 112 (λ_{Ex} = 280 nm).

externe Konzentration von 0.1 eq Eosin Y **112** verwendet werden. Abbildung 195 zeigt die Emissionsspektren **66**-und **67**-dotierter DMPC/DPPC-Liposomen in Gegenwart von 0.0 – 1.0 eq Eosin Y **112**.

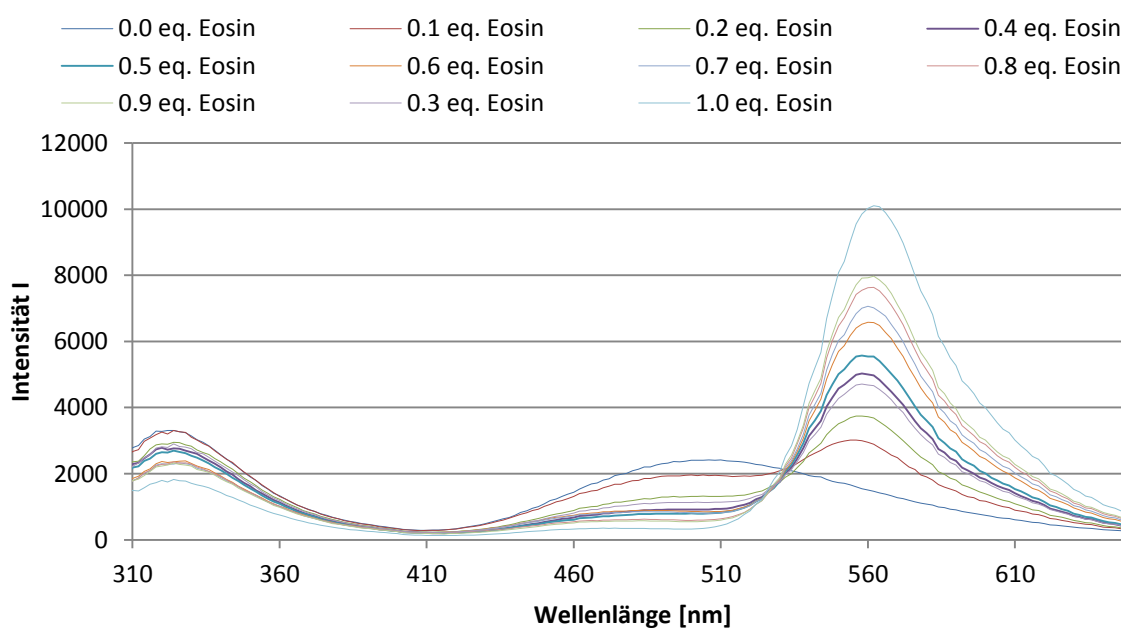


Abbildung 195: Fluoreszenzspektren nach externer Zugabe von 0.0 eq. - 1.0 eq. Eosin Y 112.

Diese Messungen zeigten, dass bei diesen experimentellen Rahmenbedingungen ein stabiles System aus **66/67** und **112** etabliert werden kann, mit dem es möglich sein sollte, aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. Für das eigentliche Experiment zum Nachweis der Einlagerungsgeometrie von **66** und **67** wurden Liposomen mit einer Dotierung von je 2.5 % **66** und **67** nach der Standard-Methode präpariert (vgl. 3.3.3.2) und für 30 min equilibriert. Danach wurden 0.1 eq. Eosin Y **112** (bezogen auf **67**) zugegeben und die Intensitäten der Emissionsmaxima bestimmt. Durch die Zugabe konnte direkt ein Rückgang der Fluoreszenzintensität des Dansylfluorophors bei 510 nm und das Auftreten eines starken Eosin Y-Emission bei 560 nm detektiert werden. Die Intensität der Tryptophanemission bei 330 nm bleibt durch die Zugabe der externen Fluoreszenzsonde unverändert (Abbildung 196 links). Nach Konstanz der Emissionsintensitäten wurden 100 eq DET zugegeben und wiederum die Änderung der Intensitäten der Emissionsmaxima simultan verfolgt (Abbildung 196 links).

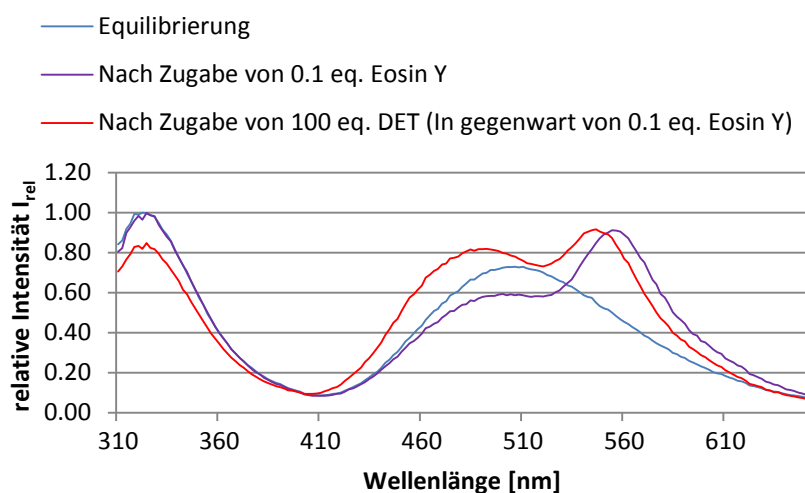


Abbildung 196: links: Signaltransduktionsexperiment (2.5 % **66** - 2.5 % **67** in DMPC/DPPC = 90%/10 %) in Gegenwart von 0.1 eq. Eosin Y **112** (extern); rechts: Farbwechsel nach Zugabe des Botenstoffs DET.

Die Zugabe des Botenstoffs DET induzierte auch bei diesem System, den bereits bei den Experimenten ohne externe Zugabe von Eosin Y **112**, beobachteten Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer zwischen den Rezeptoren **66** und **67**, der sich durch den Rückgang der Fluoreszenzintensität der Tryptophanemission (330 nm) und den Anstieg der Fluoreszenzintensität der Dansylemission (510 nm) zeigt. Zudem ist auch hier die bereits beobachtete bathochrome Verschiebung des Dansylemissionsmaximums zu detektieren. Ein, durch den Botenstoff DET induziertes Multi-FRET-System, lässt sich durch die unveränderte Eosin Y-Emission (560 nm) nicht beobachten (Abbildung 196 links). Die FRET-Effizienz bezüglich der Abnahme der Tryptophanemission entspricht mit 20 % der, die ohne Zugabe der Fluoreszenzsonde **112**, beobachtet werden kann (vgl. 3.4.6).

Zudem führt die Zugabe des externen Fluorophors zu einem weiteren interessanten Nebeneffekt. Der Prozess der botenstoff-induzierten Signalleitung kann durch eine Farbänderung, vermutlich durch die Verschiebung des Dansylemissionsmaximums zu kleineren Wellenlängen, der zu einer veränderten Farbmischung führt, direkt mit dem bloßen Auge detektiert werden (Abbildung 196 rechts). Eine direkte Wechselwirkung des Botenstoffs DET mit einem der Fluorophore, der diesen Farbwechsel verursachen könnte, konnte durch Referenzexperimente ausgeschlossen werden.

Die Ergebnisse die mit diesem Experiment erhalten werden konnten, lassen nur einen Schluss bezüglich der Einlagerungsgeometrie der Transmembranrezeptoren **66** und **67** zu. Durch den Zusatz der Fluoreszenzsonde in das extrazelluläre Medium und das nicht beobachtete Auftreten eines botenstoff-induzierten Multi-FRET-Systems, müssen die Rezeptoren **66** und **67** in einer gestreckten Konformation in das Liposom eingelagert sein (vgl. Abbildung 189 links). Der beobachtete Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer zwischen dem Tryptophan- und dem Dansylrest kann nur in Abwesenheit von Eosin Y **112** auftreten und somit nur im inneren Kompartiment des Liposoms erfolgt sein. Durch die vorangegangenen Experimente (3.4.7), in denen eine Permeabilität der Membran für den Botenstoff DET ausgeschlossen werden konnte, konnte die Unidirektionalität der Signalleitung bewiesen werden. Somit konnte durch dieses Experiment zusätzlich bewiesen werden, dass die Signalleitung nicht nur unidirektional, sondern auch transmembraner Natur ist. Zusammenfassend ist somit eine echte künstliche Signaltransduktion mit den Rezeptoren **66** und **67** bewiesen, da die drei Teilschritte, molekulare Erkennung des Botenstoffs im extrazellulären Medium, Signalweiterleitung über die Doppelmembran und das Auftreten eines *second messenger* Signals im Inneren des Vesikels eindeutig nachvollzogen werden konnten.

3.4.8.4.2 Experimente mit inkludiertem Eosin Y 112 und den Rezeptoren 66 und 67

Um die Ergebnisse auf einem zweiten Weg abzusichern, sollte ein weiteres Experiment mit der Fluoreszenzsonde Eosin Y **112** durchgeführt werden. Um den beobachteten Sachverhalt zu bestätigen, wurden die Rezeptoren **66** und **67** in DMPC/DPPC-Liposomen eingelagert und in Gegenwart von Eosin Y **112** präpariert, um den zusätzlichen Fluorophor in das Innere der Liposomen einzuschließen. Hierzu wurde ein dünner Film, bestehend aus dem Lipidmaterial und den beiden Transmembranbausteinen **66** und **67** in MES-Puffer unter Zugabe von 0.1 eq. Eosin Y **112** aufgenommen, über die Phasenübergangstemperatur erwärmt und für mehrere Minuten gevortext. Um die Inklusion zu vervollständigen, wurden die multilamellaren Vesikel in mehreren Gefrier-Tau-Zyklen erst in flüssigem Stickstoff einge-

froren und danach langsam über die Phasenübergangstemperatur erwärmt. Nach Extrusion der Liposomenlösung durch eine Polycarbonatmembran wurde die Lösung unilamellarer Liposomen mit Hilfe einer Sephadex G-60 beladenen Säule von nicht eingelassenen Resten des Farbstoffs **112** befreit. Bei diesem experimentellen Setup und den zuvor erhaltenen Ergebnissen ist für dieses System ein botenstoff-induziertes Multi-FRET-System aus den drei Fluoreszenzfarbstoffen zu erwarten (Abbildung 191). Das Signaltransduktionsexperiment wurde nach dem Standard-Verfahren durchgeführt. Nach der Equilibrierungsphase kann das Vorliegen eines Multi-FRET-System durch die drei gut aufgelösten Emissionsmaxima detektiert werden (Abbildung 197).

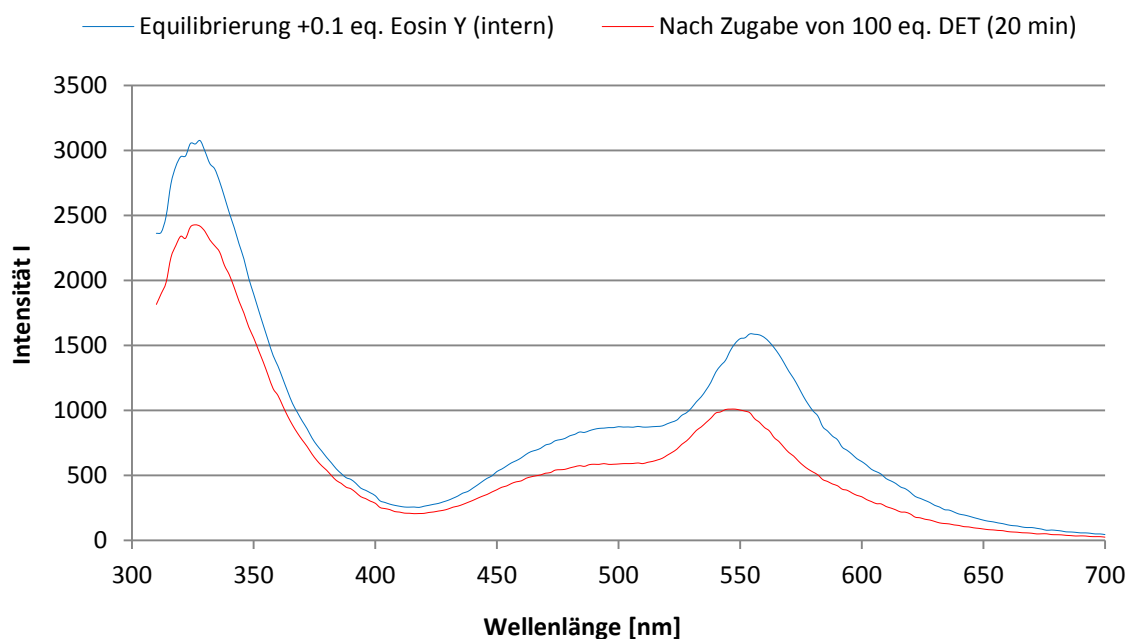


Abbildung 197: Signaltransduktionsexperiment (2.5 % 66 - 2.5 % 67 in DMPC/DPPC = 90 %/10 %) in Gegenwart von 0.1 eq. Eosin Y **112** (intern).

Auf die Zugabe von 100 eq. DET ist ein Rückgang der Intensitäten aller drei Emissionsmaxima zu beobachten (Abbildung 197). Diese Beobachtung entspricht nicht ganz der zu erwartenden Änderung für diesen experimentellen Aufbau. Durch die extrazelluläre Komplexierung des Botenstoffs sollte es im ersten Schritt der Signalkaskade zu der detektierten Energie-Übertragung vom Tryptophan- auf den Dansylfluorophor kommen (Erniedrigung der Intensität bei 330 nm). Die resultierende Anregung der Dansylemission (510 nm) wird in diesem Fall direkt auf das Eosin Y **112** übertragen und führt ebenfalls zum Rückgang der Dansylemission. Dies sollte wiederum zu einer verstärkten Emission bei 560 nm führen. Diese kann nicht beobachtet werden. Die Intensität bei 560 nm wird ebenfalls erniedrigt. Hierfür könnte ein konzentrationsabhängiges Quenchen der Eosin Y-Emission verantwortlich sein, wie es auch für andere Fluorophore, wie z.B. Carboxyfluorescein, beim Einschluss in Liposomen beobachtet werden kann. ^[104,251,252] Betrachtet man die gegensätzliche Änderung der

Dansylemission bei 510 nm im Vergleich zum Experiment mit externer Zugabe von Eosin Y **112**, so kann auch mit Hilfe dieses Experiments ein eindeutiger Hinweis auf die gestreckte Konformation der Rezeptoren **66** und **67** erhalten werden. Im Falle einer „U-förmigen“ Einlagerung hätte in diesem Fall ebenfalls ein Anstieg der Dansylemission beobachtet werden müssen (Abbildung 192).

Abschließend wurde die Einlagerung des Bausteins **66** in eine Lipiddoppelschicht mittels einer Moleküldynamik-Simulation untersucht. Hierzu wurde der Rezeptor **66** einmal in einer gestreckten und einmal in der „U-förmigen“ Konformation einer 9x9-Matrix aus DPPC-Lipiden vororientiert und die energieminierten Strukturen in wässriger Umgebung bestimmt (Abbildung 198). Betrachtet man die beiden möglichen Einlagerungsgeometrien, so ist deutlich zu erkennen, dass die „U-förmige“ Einlagerung, in ein Blatt der Doppelschicht, eine deutlich größere Störung der lamellaren Struktur mit sich bringt. Im Gegensatz zur gestreckten Einlagerung sind zudem die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Monoschichten in einem größeren Maße gestört, so dass sich auch durch die Betrachtung der energieminierten Strukturen ableiten lässt, dass die gestreckte Einlagerung in die Liposomen präferiert wird.

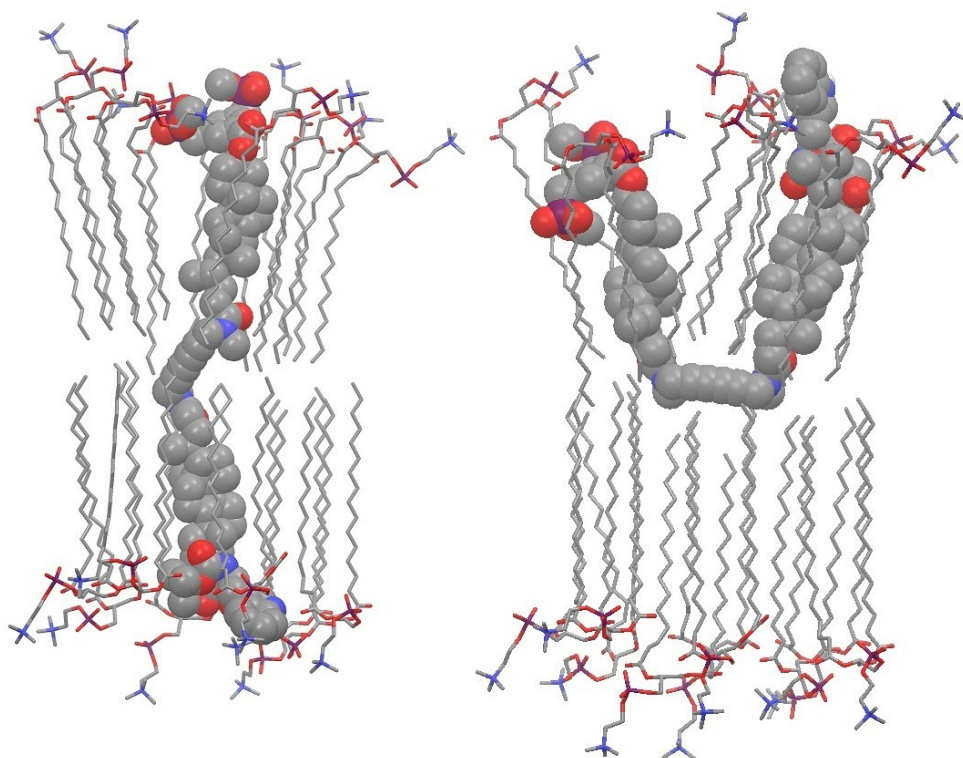


Abbildung 198: Energieminimierte Struktur des Rezeptors **66** in einer DPPC-Lipid-Umgebung; links: gestreckte Einlagerung; rechts: „U-förmige“ Einlagerung [Macromodel 7.2, Amber, in Wasser, 1000 Schritte].

3.4.9 Ausschluss eines interzellulären Energie-Transfers

Durch die statistische Einlagerung der Rezeptoren **66** und **67** sind die Tryptophan- und Dansyl-Einheiten sowohl auf der Innen-, als auch auf der Außenseite der Membran lokalisiert. Um auszuschließen, dass die Komplexbildung des Botenstoffs DET durch zwei Bisphosphonat-Pinzetten, die auf zwei unterschiedlichen Liposomen lokalisiert sind, erfolgt und damit einhergehend eine Verringerung des räumlichen Abstands zwischen ebenfalls auf der Außenseite der Membran verankerten Fluorophoren bedingt ist (Abbildung 199), wurden im folgenden Experiment, Rezeptor **66** und **67** getrennt voneinander in Liposomen eingelagert und die Liposomenmischung der separierten Rezeptoren **66** und **67** mit dem Botenstoff DET versetzt.

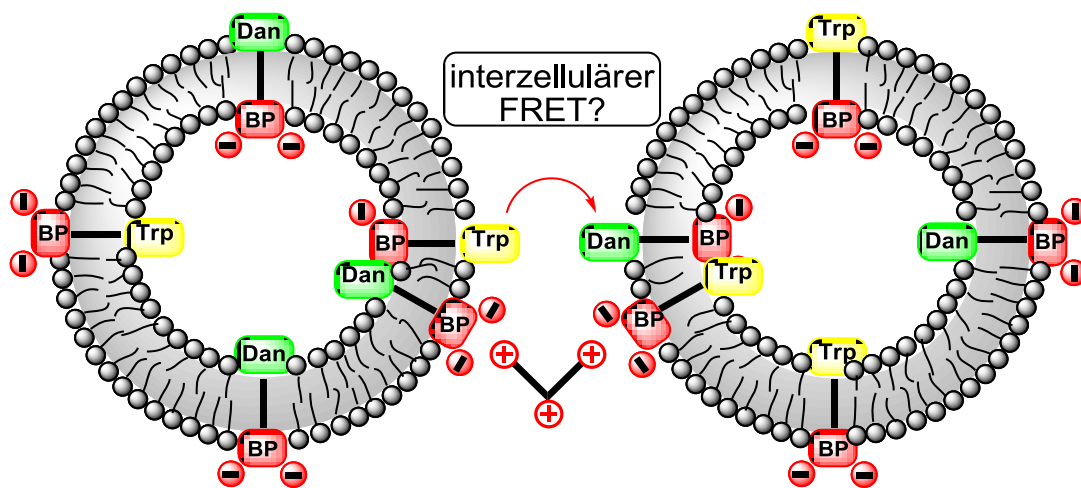


Abbildung 199: Schematische Darstellung eines möglichen interzellulären FRET.

Die Zugabe des Triamins DET führte zu keiner Änderung der Fluoreszenzintensitäten, woraus zu schließen ist, dass keine Energieübertragung zwischen den Liposomen stattgefunden hat. (Abbildung 200 links). Mit Hilfe dieses einfachen Experiments konnte somit ist der Nachweis erbracht werden, dass ein möglicher interzellulärer Energietransfer keinen Beitrag zur beobachteten Signaltransduktion liefert.

Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den von *Hunter et al.* durchgeführten Untersuchungen zur Bestimmung von Bindungskonstanten und Bindungsmodi von membranverankerten Rezeptoren.^[145] In Bindungsstudien mit den Transmembranrezeptor **48** konnte gezeigt werden, dass der Bindungsmodus membranverankerter Rezeptoren von der Konzentration in der Membran abhängig ist. Mit steigendem Rezeptorgehalt ist ausschließlich eine intrazelluläre Komplexbildung zu beobachten (Abbildung 200 rechts). Nur bei sehr geringen Konzentrationen (0.1 %) ist eine intervesikuläre Komplexbildung des Liganden der bevorzugte Bindungsmodus. Bei der verwendeten Dotierung von 2.5 % tritt die intervesikuläre Ligandenbindung vollkommen in den Hintergrund (Abbildung 200 rechts).

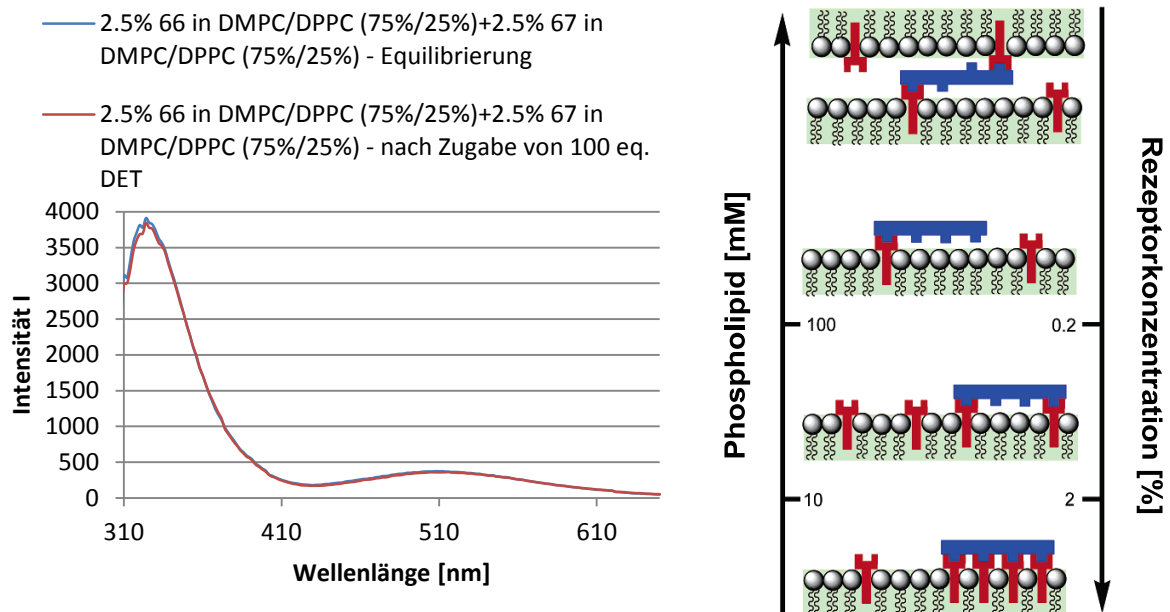


Abbildung 200: links: Experimente mit unterschiedlich getrennt dotierten Liposomen 2.5 % 66 und 2.5 % 67 in DMPC/DPPC; rechts: postulierte konzentrationsabhängige Bindungsmodi nach Hunter et al.^[145]

3.4.10 Untersuchung des permanenten Energie-Transfers

Zudem ist eine Konstellation der Rezeptoren 66 und 67 möglich, die nicht den detektierten, induzierten FRET-Effekt beeinflusst, sondern einen Beitrag zum detektierten permanenten Energietransfer liefern kann. Unter der Voraussetzung, dass der Abstand der Fluorophore auf den unterschiedlichen Seiten der Membran nicht hinreichend groß ist, kann ein transmembraner FRET einen Beitrag zum permanenten Energietransfer liefern (Abbildung 201). Unter Verwendung von Gleichung (9) soll dieser mögliche Beitrag im Folgenden abgeschätzt werden:

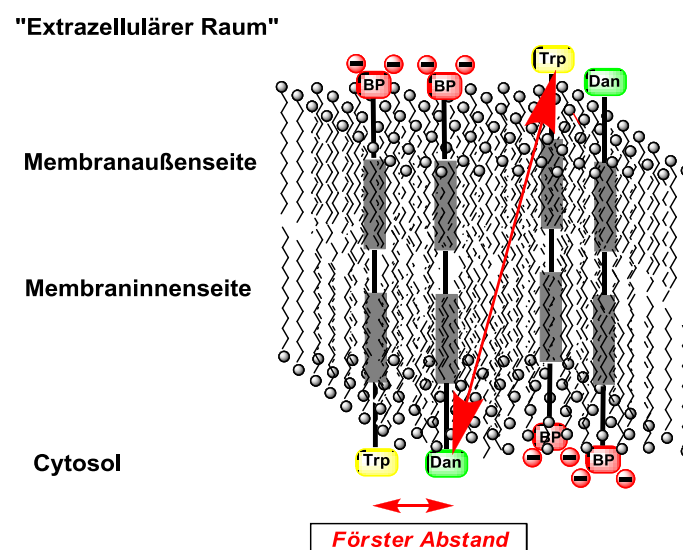


Abbildung 201: Möglicher transmembraner Energie-Transfer.

$$E_{FRET} = \frac{1}{\left[1 + \left(\frac{R^6}{R_0^6}\right)\right]} \quad (9)$$

Bei der Berechnung der FRET-Effizienz für die, in Abbildung 201 gezeigt Konstellation der Rezeptoren **66** und **67** in der Doppelmembran, sollen folgende Vereinfachungen gemacht werden:

- Die Ausdehnung Fluorophore wird an der Membranoberfläche als punktförmig angesehen.
- Für den Abstand R der beiden Fluorophore wird die Schichtdicke $h = 4 \text{ nm}$ der DPPC-Doppelmembran herangezogen (Abbildung 202).
- Der Abstand R wird so behandelt, als wenn sich die beiden Fluorophore idealisiert senkrecht gegenüberstehen.
- Für den Förster-Radius wird der Literaturwert von 2.1 nm verwendet. Hierbei wird vereinfachend angenommen, dass der Orientierungsfaktor $k = 2/3$ ist. Dieser gilt für frei rotierbare Fluorophore in Lösung. Bei der Lokalisation in Membranen und Biomolekülen kann dieser Wert zwischen 1 und 4 variieren (vgl. Kapitel 3.2.2).^[253]

Somit ergibt sich:

$$E_{FRET} = \frac{1}{\left[1 + \left(\frac{(4.0 \text{ nm})^6}{(2.1 \text{ nm})^6}\right)\right]}$$

$$= 0.021$$

Der Beitrag, den ein eventuell auftretender transmembraner Energie-Transfer über die Doppelmembran hinweg liefert, ist somit mit 2.1 % vernachlässigbar klein. Der gemessene Wert für das Rezeptorsystem **66/67** beträgt in DMPC/DPPC-Liposomen (75 %/25 %) etwa 50 %.

Somit muss der detektierte permanente Energie-Transfer durch andere Ursachen hervorgerufen werden. Eine mögliche Ursache könnte in der bereits, in Kapitel 3.4.6, angesprochenen zu hohen Dotierung der Liposomenmembran mit den Rezeptoren **66** und **67** liegen. Für diesen Sachverhalt spricht, dass, wie bereits gezeigt (vgl. 3.4.6), der permanente FRET fast vollständig zurückgeht, wenn die Dotierung auf je 1.5 % der Rezeptoren **66** und **67** erniedrigt wird. Allerdings kann in diesem Konzentrationsbereich kein Signal mehr durch den primären Botenstoff induziert werden. Ursache hierfür ist die Selektivität des Systems für die kompakten Botenstoffe DET, EDA (**113**) und TREN (**114**).

Daher soll zusätzlich zu den bisherigen Betrachtungen der Beitrag zu einem permanenten FRET-Effekts in Folge eines zu geringen räumlichen Abstandes ermittelt werden.

Dazu soll der mittlere Anstand R_M der Rezeptoren **66** und **67**, unter der Annahme einer statistischen Verteilung, in der Membranoberfläche eines Liposoms abgeschätzt werden:

Randbedingungen:

Konzentration c der Phosphatidylcholine: c (DPPC/DMPC) = 2 mmol/L

Konzentration c_{Rez} der Rezeptoren: c_{Rez} (**66/67**) = 5×10^{-5} mmol/L

Durchmesser d der präparierten Liposomen: $d = 200$ nm

Schichtdicke h der Lipiddoppelschicht: $h = 4$ nm (Für DPPC)^[217]

Durchmesser A_{Kopf} der Phosphatidylcholinkopfgruppe: $A = 0.71$ nm²^[217]

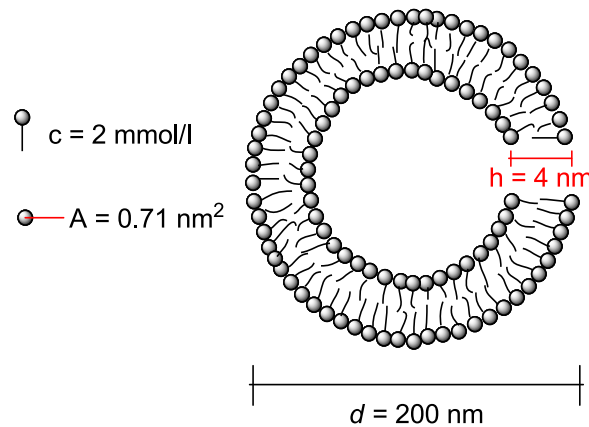


Abbildung 202: Schematische Darstellung eines Liposoms mit 200 nm Durchmesser – geometrische Randbedingungen.

Die Anzahl N_{tot} der Lipidmoleküle, die zum Aufbau eines unilamellaren Liposoms mit einem Durchmesser $d = 200$ nm benötigt werden, kann über

$$N_{\text{tot}} = \frac{\left[4\pi \left(\frac{d}{2} \right)^2 \right] + \left[4\pi \left(\frac{d}{2} - h \right)^2 \right]}{A}$$

mit $\left[4\pi \left(\frac{d}{2} \right)^2 \right]$ für die Oberfläche A_A des äußeren Monolayers

und $\left[4\pi \left(\frac{d}{2} - h \right)^2 \right]$ für die Oberfläche A_I des inneren Monolayers

berechnet werden.

Mit $d = 200 \text{ nm}$, $h = 4 \text{ nm}$ und $A = 0.71 \text{ nm}^2$ ergibt sich:

$$\begin{aligned}
 N_{tot} &= \frac{\left[4\pi \left(\frac{200}{2}\right)^2\right] + \left[4\pi \left(\frac{200}{2} - 4\right)^2\right]}{0.71} \left[\frac{\text{nm}^2}{\text{nm}^2}\right] \\
 &= \frac{4\pi}{0.71} \times (100^2 + 96^2) \\
 &= 17.699 \times (10^4 + 0.922 \times 10^4) \\
 &= 17.699 \times 1.922 \times 10^4
 \end{aligned}$$

$$N_{tot} = 3.402 \times 10^5.$$

Die Anzahl N_{Lip} der gebildeten Liposomen bei einer Lipidkonzentration c (DPPC/DMPC) = 2 mmol/L) kann somit über

$$\begin{aligned}
 N_{Lip} &= \frac{c(\text{Lipid}) \times N_A}{N_{tot}} \\
 &= \frac{2 \times 10^{-3} \times 6.022 \times 10^{23}}{3.402 \times 10^5} \left[\frac{\text{mol}}{\text{mol} \times L}\right] \\
 &= \frac{2 \times 6.022}{3.402} \times 10^{15} [L^{-1}]
 \end{aligned}$$

$$N_{Lip} = 3.54 \times 10^{15} L^{-1}$$

ermittelt werden.

Für die Anzahl N_{Rez} der Rezeptoren **66** und **67** ergibt sich bei einer Gesamtkonzentration c_{Rez} (**66/67**) = $5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$):

$$\begin{aligned}
 N_{Rez} &= c_{Rez} \times N_A \\
 &= 5 \times 10^{-5} \times 6.022 \times 10^{23} \left[\frac{\text{mol}}{\text{mol} \times L}\right] \\
 &= 5 \times 6.022 \times 10^{18} [L^{-1}]
 \end{aligned}$$

$$N_{Rez} = 3.011 \times 10^{19} L^{-1}.$$

Da von einer statistischen Verteilung der Rezeptoren **66** und **67** auf alle vorhandenen Liposomen ausgegangen werden kann, berechnet sich für die Anzahl $N_{Rez/Lip}$ der Rezeptoren pro Liposom zu:

$$\begin{aligned} N_{Rez/Lip} &= \frac{N_{Rez}}{N_{Lip}} \\ &= \frac{3.011 \times 10^{19}}{3.54 \times 10^{15}} \left[\frac{L}{L} \right] \\ &= \frac{3.011}{3.54} \times 10^4 \\ &= \frac{3.011}{3.54} \times 10^4 \end{aligned}$$

$$N_{Rez/Lip} = 8.506 \times 10^3.$$

Mit der Vereinfachung, dass die Rezeptoren punktförmig sind und keine eigene Ausdehnung besitzen, lässt sich die zur Verfügung stehende Fläche pro Rezeptor bzw. Kopfgruppe für die Innen- und für die Außenseite berechnen. Da die Rezeptoren als membrandurchspannend angesehen werden und ausschließlich der mittlere Abstand R_M der Fluorophore von Interesse ist, muss die statistische Einlagerung der Rezeptoren bezüglich der Orientierung der Kopfgruppen ins innere bzw. äußere Kompartiment berücksichtigt werden. Die Anzahl N_{Fluo} der Fluorophore auf der Innen- bzw. Außenseite verringert sich somit auf:

$$N_{Fluo} = \frac{N_{Rez/Lip}}{2} = \frac{8.506 \times 10^3}{2}$$

$$N_{Fluo} = 4.253 \times 10^3.$$

Die auf der Membranaußenseite zur Verfügung stehende Fläche A_{Fluo} pro Fluorophor ist somit:

$$A_{Fluo} = \frac{\left[4\pi \left(\frac{d}{2} \right)^2 \right]}{N_{Fluo}}$$

$$= \frac{\left[4\pi \left(\frac{200}{2}\right)^2\right]}{4.253 \times 10^3} [nm^2]$$

$$= \frac{4\pi}{4.253} \times \frac{10^4}{10^3} [nm^2]$$

$$A_{Fluo} = 29.547 \text{ nm}^2.$$

Die auf der Membraninnenseite zur Verfügung stehende Fläche A_{Fluo} pro Fluorophor ergibt sich in analoger Weise zu:

$$A_{Fluo} = \frac{\left[4\pi \left(\frac{d}{2} - h\right)^2\right]}{N_{Fluo}}$$

$$= \frac{\left[4\pi \left(\frac{200}{2} - 4\right)^2\right]}{N_{Fluo}} [nm^2]$$

$$= \frac{[4\pi \times (96)^2]}{4.253 \times 10^3} [nm^2]$$

$$= \frac{4\pi \times 9.216}{4.253} \times \frac{10^3}{10^3} [nm^2]$$

$$A_{Fluo} = 27.231 \text{ nm}^2.$$

Der mittlere Abstand R_M der Fluorophore kann aus den zuvor berechneten Fläche A_{Fluo} berechnet werden:

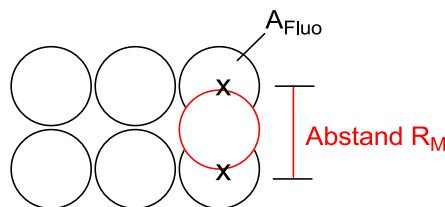


Abbildung 203: Schematische Darstellung des mittleren Abstands der Rezeptoren 66 und 67 an der Membranoberfläche.

Membranaußenseite:

Aus

$$A_{Fluo} = \pi \left(\frac{R_M}{2} \right)^2$$

ergibt sich:

$$\begin{aligned} R_M &= 2 \times \sqrt{\frac{A_{Fluo}}{\pi}} \\ &= 1.1284 \times \sqrt{A_{Fluo}} \\ &= 1.1284 \times \sqrt{29.547} [nm] \end{aligned}$$

$$R_M = 6.134 \text{ nm}.$$

Membraninnenseite:

$$R_M = 1.1284 \times \sqrt{27.231} [nm]$$

$$R_M = 5.888 \text{ nm}.$$

Mit Hilfe der bereits verwendeten Formel (8) kann nun die FRET-Effizienz aus den ermittelten mittleren Abständen R_M (Innen) und R_M (Außen) bestimmt werden:

$$E_{FRET} = \frac{1}{\left[1 + \left(\frac{R^6}{R_0^6} \right) \right]} \quad (8)$$

Membranaußenseite:

$$\begin{aligned} E_{FRET}(\text{Innen}) &= \frac{1}{\left[1 + \left(\frac{(6.134 \text{ nm})^6}{(2.1 \text{ nm})^6} \right) \right]} \\ &= 0.0016 \end{aligned}$$

Membraninnenseite:

$$E_{FRET}(Innen) = \frac{1}{\left[1 + \left(\frac{(5.888 \text{ nm})^6}{(2.1 \text{ nm})^6}\right)\right]}$$

$$= 0.0021$$

Die Ergebnisse der Betrachtung zeigen, dass der Beitrag zu einem permanenten Energie-Transfer, bei einer statistischen Verteilung der Rezeptoren in der Membran nach geringer ist, als der Beitrag des transmembranen Energie-Transfers. Zudem wurde des Weiteren nicht berücksichtigt, dass es aufgrund der statistischen Orientierung und Verteilung von **66** und **67** zudem noch zur Bildung unproduktiver homodimerer Rezeptorpaare in der Membran kommt (vgl. Kapitel 3.3.1).

Als weitere Ursache steht die bereits erwähnte Ausbildung von Rezeptordomänen bzw. *lipid rafts* zur Diskussion, d.h., dass die Bildung von Rezeptor-Clustern betrachtet werden muss. Für das Auftreten von solchen Molekül-Clustern spricht, dass die Rezeptoren **66** und **67** aus großen hydrophoben Transmembransegmenten aufgebaut sind, die innerhalb der Doppelmembran in der Lage sein sollten, untereinander über van-der-Waals-Wechselwirkungen in einen engen Kontakt zu treten und Dimere oder Oligomere zu bilden. Gegen einen direkten Kontakt der Rezeptoren in der Membran spricht auch in diesem Fall das Verschwinden des permanenten Energietransfers bei Erniedrigung der Membrandotierung. Des Weiteren ist das Design der Transmembranbausteine so ausgelegt, dass die Aggregatbildung durch die jeweils zweifach negativ geladenen Bisphosphonat-Pinzetten über repulsive elektrostatische Wechselwirkungen ausgeschlossen sein sollte.

Bei den bisherigen theoretischen Betrachtungen wurden allerdings zwei Sachverhalte noch nicht berücksichtigt. Der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer an der Oberfläche von Liposomen oder allgemein an Membranoberflächen muss unter veränderten Randbedingungen betrachtet werden, da die Fluorophore eine eingeschränkte Beweglichkeit in der Membran besitzen. Der Energietransfer der verankerten Rezeptoren kann an der Oberfläche nur in zwei Dimensionen erfolgen. Der veränderte Orientierungsfaktor k besitzt einen von $2/3$ verschiedenen Wert, welcher nur für frei rotierbare Fluorophore in freier Lösung gilt. Daher ist die Energieübertragung in Membranen effizienter und folgt anderen Abhängigkeiten.^[223,224,235,353] Veranschaulichen lässt sich dieses anhand von Gleichung (8):

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-23} \phi k^2 h^{-4} J(1) \quad (8)$$

Ein, im Vergleich zur freien Lösung, erhöhter Wert von k hat eine Vergrößerung des Förster-Radius R_0 zu Folge, was gleichbedeutend mit einem vergrößertem Abstand ist, bei

dem 50 % der Energie vom Fluoreszenz-Donor auf den Fluoreszenz-Akzeptor übertragen werden. Bei einem Wert für $k^2 = 1$ ist die resultierende Förster-Radius R_0 um den Faktor 0.33 höher als für den Wert $k^2 = 2/3$, da dieser in Gleichung (8) mit der zweiten Potenz eingeht. Somit ist auch die Energie-Übertragung, die nach den vorigen Überlegungen bei statistischer Einlagerung ermittelt wurde und ohne Berücksichtigung des veränderten Orientierungsfaktors vorgenommen wurde, erhöht.

Des Weiteren zeigte sich bei den Signaltransduktionsexperimenten mit den Rezeptoren **66** und **67** in DMPC/DPPC-Gemischen, dass die Transmembranbausteine entweder bevorzugt in eines der verwendeten Lipidmaterialien eingelagert werden, oder aber durch Zugabe des Botenstoffs eine Phasenseparation eingeleitet wird. Beide Konstellationen haben zur Folge, dass die effektiv genutzte Oberfläche geringer ist, als die theoretisch zur Verfügung stehende Oberfläche. Dieses bedingt wiederum eine Verringerung des räumlichen Abstands und somit eine Erhöhung der permanenten Energieübertragung. FRET in zwei Dimensionen ist zudem ausschließlich abhängig von der Konzentration des Fluoreszenz-Akzeptors, aber unabhängig von der Konzentration des Fluoreszenz-Donors, da bei einer stochastischen Verteilung des Akzeptors um den Donor eine Energieübertragung auf mehrere Akzeptoren stattfinden kann.^[223,224,235,353] Das Vorliegen einer solchen Verteilung kann durch FRET-Effizienzmessungen mit konstanter Donor- und variabler Akzeptorkonzentration nachgewiesen werden und sollte in abschließenden Messungen überprüft werden. Zudem bietet dieses Experiment die Möglichkeit zu überprüfen, ob durch die Erhöhung einer Rezeptorkonzentration eventuell eine weitere Erhöhung der botenstoff-induzierten Signaltransduktion möglich ist.

3.4.11 Bestimmung der FRET-Effizienz des Systems **66** und **67** in DMPC/DPPC

Für die Experimente zur Bestimmung der FRET-Effizienz des Systems **66/67** in DMPC/DPPC-Liposomen (90 %/10 %) wurden Liposomen mit einer konstanten Dotierung des Rezeptors **66** (2.5 %) und einer steigenden Dotierung des Rezeptors **67** nach dem Extrusionsverfahren hergestellt und die Signaltransduktionsexperimente nach dem bekannten Verfahren durchgeführt. Als Referenz wurde ein **66**-dotiertes Liposom (2.5 %) vermessen, um abschließend die FRET-Effizienz der unterschiedlich dotierten Liposomen vor und nach Zugabe von 50 eq. des Botenstoffs DET bestimmen zu können. In Abbildung 204 sind die Ergebnisse der Experimente zusammengefasst.

Es zeigte sich, dass durch sukzessive Erhöhung der Akzeptor-Konzentration eine Steigerung der FRET-Effizienz bis maximal 75 %, bezogen auf die Abnahme der Tryptophan-

Emission, möglich ist. Der detektierte permanente FRET-Effekt bei äquimolarer Einlagerung der Rezeptoren **66** und **67** beträgt 55 %. Interessanterweise ist auch durch die Erhöhung der Konzentration von **67** keine weitere Steigerung der botenstoff-induzierten Signaltransduktion mehr möglich. Diese Beobachtung konnte bereits bei den Experimenten mit simultaner Erhöhung beider Rezeptorkonzentrationen beobachtet werden (vgl. 3.4.6). Die Erhöhung der Akzeptor-Dotierung hat zwar einen deutlichen Anstieg der FRET-Effizienz ohne Zugabe

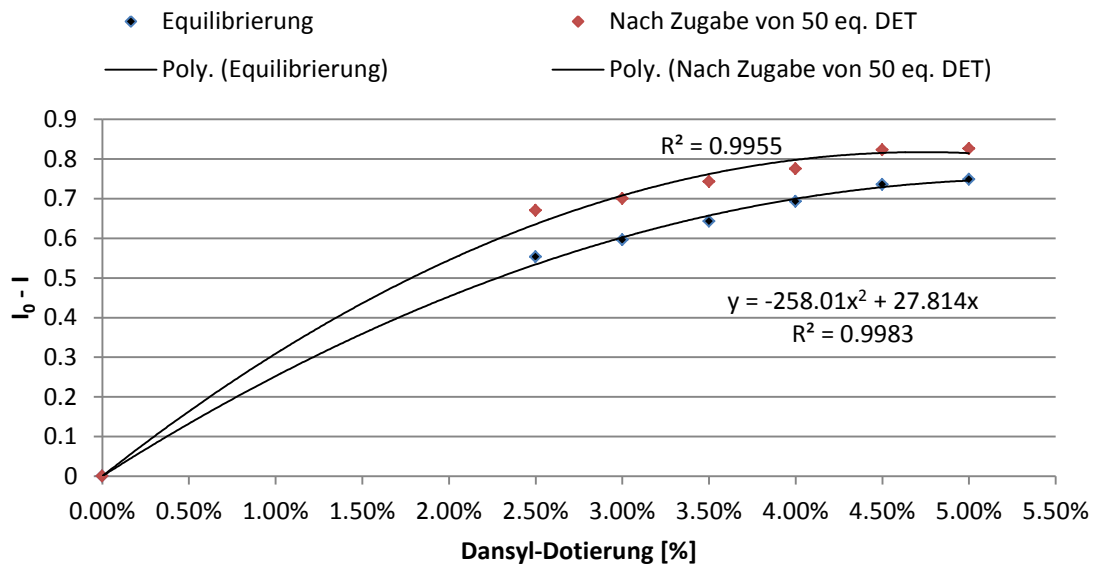


Abbildung 204: Änderung der Tryptophan-Donor-Emission (330 nm) in Abhängigkeit der Dansyl-Konzentration (2.5 % Tryptophan - x % Dansyl in 90 % DMPC - 10 % DPPC) nach Zugabe von 50 eq. DET.

des Botenstoffs zur Folge, der zusätzliche Beitrag, der durch weitere Verringerung des räumlichen Abstands der Rezeptoren durch Erkennung des DET verursacht wird, nimmt sogar mit steigender Akzeptorkonzentration ab (Abbildung 205). D.h., dass bei äquimolarer Dotie-

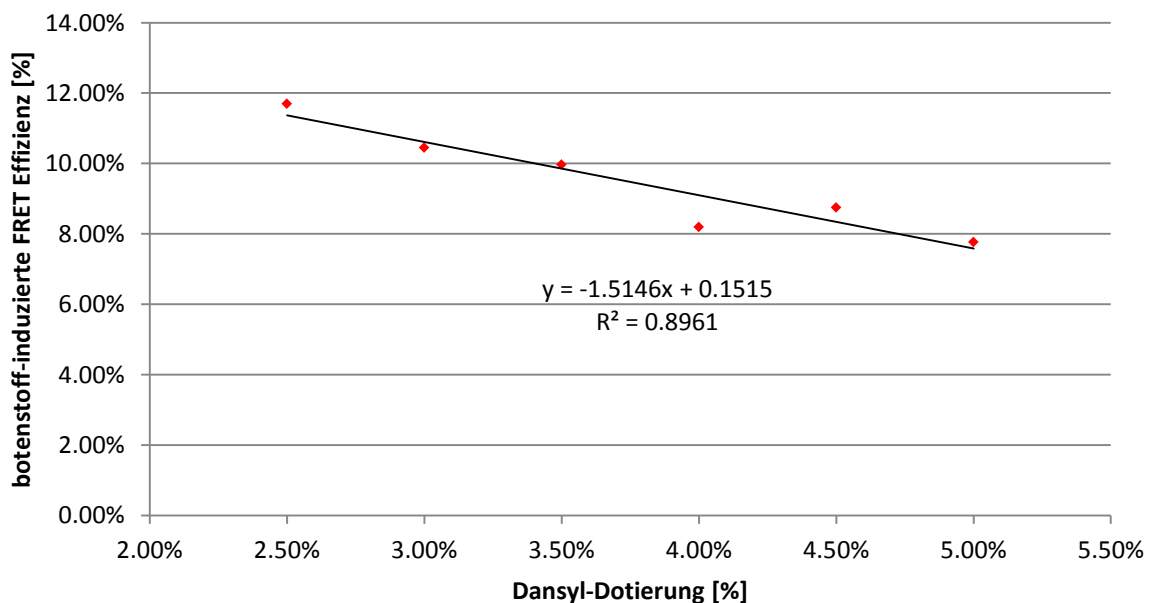


Abbildung 205: Botenstoff-induzierte Erhöhung der FRET-Effizienz in Abhängigkeit von der Akzeptor-Dotierung.

rung mit je 2.5 % der Rezeptoren **66** und **67** das maximal zu erreichende Botenstoff-induzierte Signal für dieses System tatsächlich erreicht ist (Tabelle 5).

Tabelle 5: FRET-Effizienz [%] in Abhängigkeit der Dansyl-Konzentration (2.5 % **66** – x % **67** in 90 % DMPC – 10 % DPPC).

Dotierung		relative Intensität I (328 nm)		FRET-Effizienz [%]		
Tryptophan	Dansyl	Equilibrierung	Nach 50 eq. DET	Equilibrierung	Nach 50 eq. DET	Zunahme
2.5%	0.0%	1.0	1.0	0.0%	0.0%	0.0%
2.5%	2.5%	0.446	0.33	55.3%	67.0%	11.7%
2.5%	3.0%	0.404	0.299	59.6%	70.1%	10.4%
2.5%	3.5%	0.357	0.257	64.3%	74.3%	10.0%
2.5%	4.0%	0.306	0.244	69.4%	77.6%	8.2%
2.5%	4.5%	0.264	0.177	73.6%	82.3%	8.8%
2.5%	5.0%	0.251	0.174	74.9%	82.6%	7.8%

Über die FRET-Effizienz-Messungen kann gezeigt werden, dass der Fluoreszenz-Energie-Transfer zwischen den Rezeptoren **66** und **67** in den Liposomen abhängig von der Oberflächenkonzentration von **67** ist. Die erhaltene Effizienzkurve zeigt den typischen Verlauf eines FRET-Systems auf der Oberfläche einer Membran.^[223,224,235,353] Zudem ist der Energie-Transfer unabhängig von der Konzentration des Fluoreszenz-Akzeptors **66**, dessen Konzentrationserhöhung ausschließlich einen linearen Anstieg der Dansylemission zur Folge hat. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit der von *Fung* und *Stryer* veröffentlichten Theorie bezüglich des Fluoreszenz-Energie-Resonanz-Transfers in zwei Dimensionen.^[253] Die theoretische Behandlung des Energietransfers auf einer zweidimensionalen Oberfläche wurde von *Fung* und *Stryer* numerisch gelöst und lieferte gute Übereinstimmungen mit experimentell erhaltenen Daten.^[253] Da die numerische Betrachtung der experimentell erhaltenen Daten im Rahmen dieser Arbeit einen zu großen zusätzlichen Zeitaufwand bedeutet hätte, wurde nach einer vereinfachten Methode gesucht, die experimentellen Befunde zu verifizieren. *Wolber* und *Hudson* entwickelten eine analytische Lösung für das Förster-Energie-Transfer-Problem in zwei Dimensionen.^[254] Über diesen Ansatz wurden für verschiedene Försterradien R_0 und verschiedene Abstände R der Fluorophore, in Abhängigkeit von der Akzeptorkonzentration, theoretische FRET-Effizienz-Kurven erstellt und mit den experimentell erhaltenen Daten der Effizienzmessungen verglichen (Abbildung 204 und Abbildung 206).

Der Vergleich der Daten liefert eine deutlich erhöhte FRET-Effizienz für das betrachtete System, als es durch die theoretischen Kurven zu erwarten gewesen wäre. Selbst für einen angenommen, sehr geringen Abstand der Rezeptoren innerhalb der Membran sind die experimentellen Daten deutlich zu hoch. Diese Erhöhung um etwa 20 % lässt sich durch die theoretischen Berechnungen nicht erklären. Allerdings wurde die zugrundegelegte Oberflächenkonzentration des Dansylakzeptors **67** auf die gesamte Membran bezogen. Eine mögliche Erklärung könnte die bereits diskutierte Überlegung liefern, dass die Rezeptoren **66** und

67 nicht gleichmäßig in den verschiedenen Domänen der DMPC/DPPC-Liposomen eingelagert sind, sondern sich bevorzugt in einer Domäne befinden.

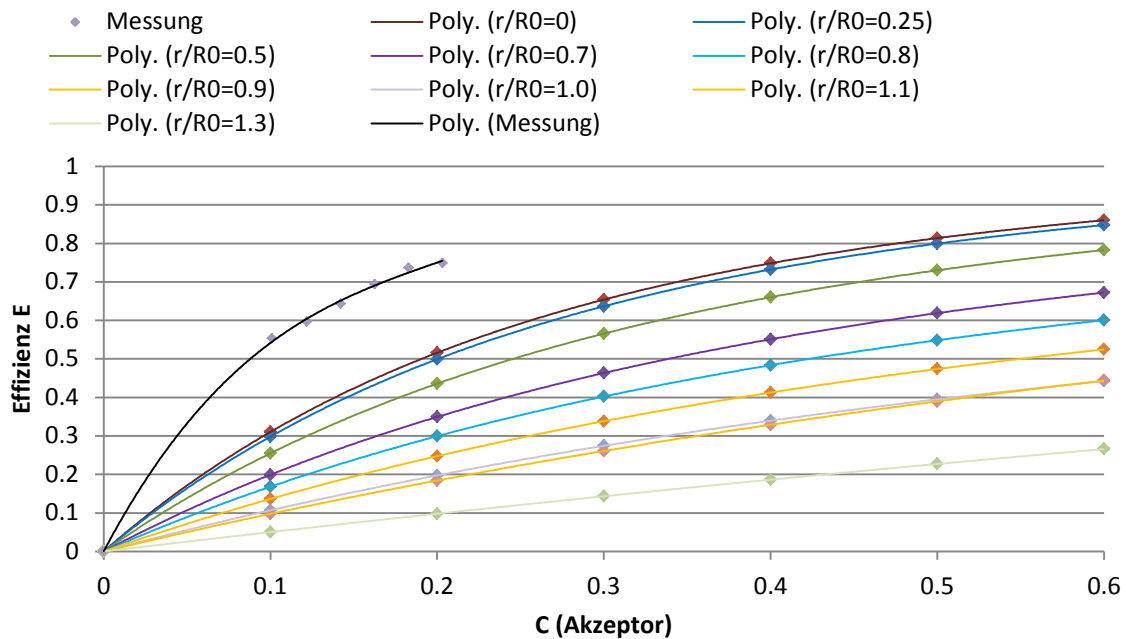


Abbildung 206: Theoretische Berechnungen der FRET-Effizienz für definierte Rezeptorabstände in einer Membranoberfläche - Vergleich mit den experimentell erhaltenen Daten; Reduzierte Akzeptorkonzentration $C = cR_0^2$.^[254]

Hieraus würde eine höhere effektive Konzentration der Rezeptoren **66** und **67**, bezogen auf die, durch die bevorzugte Domäne bereitgestellte Oberfläche, resultieren. Sollte tatsächlich die Annahme vorliegen, dass sich die Rezeptoren **66** und **67** vor Zugabe des Botenstoffs bevorzugt in der DMPC-reichen Region befinden und nach Zugabe des Botenstoffs einer Phasenseparation unterzogen werden oder in eine DPPC-Domäne wechseln (vgl. 3.4.6), müssten die theoretischen Daten entsprechend der veränderten Konzentrationsverhältnisse angepasst werden.

Auch mit Hilfe dieser Betrachtungen konnten die im Vorfeld aufgestellten Thesen nicht vollständig bestätigt werden. Es konnten jedoch eindeutige Hinweise erhalten werden, dass die Einlagerung der Rezeptoren komplexeren Strukturen unterliegt, die durch Zugabe des primären Botenstoffs Umorientierungs- bzw. Phasenumwandlungsprozessen unterzogen werden. Weitere Analysen der strukturellen Eigenschaften **66**- und **67**-dotierter Liposomen sollten im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden, da das Kernthema die konsequente Weiterentwicklung der Rezeptoren ist. Das Hauptziel bleibt die botenstoffinduzierte Abspaltung eines *second messenger*. Hierbei treten Effekte, die durch den FRET-Readout bedingt sind, zu einem großen Teil in den Hintergrund und sind für eine weiterentwickelte Generation von Transmembranrezeptoren, die nach dem Vorbild von *Hunter* und *Maue* aufgebaut werden sollen, nicht von vorrangiger Bedeutung.^[143,174]

3.4.12 Bestimmung der notwendigen Botenstoffkonzentration

In den vorangegangenen Experimenten wurde in allen Fällen ein großer Überschuss des Botenstoffs DET (100 eq.) für die Signaltransduktionsexperimente verwendet, um das, für das jeweils betrachtete System, größtmögliche Signal zu induzieren. Über ein Fluoreszenztitrationsexperiments mit **66**- und **67**-dotierten Liposomen sollte im Folgenden für die Lipidmischung DMPC/DPPC = 75 % - 25 % die Signalübertragung in Abhängigkeit der DET-Botenstoffkonzentration bestimmt werden.

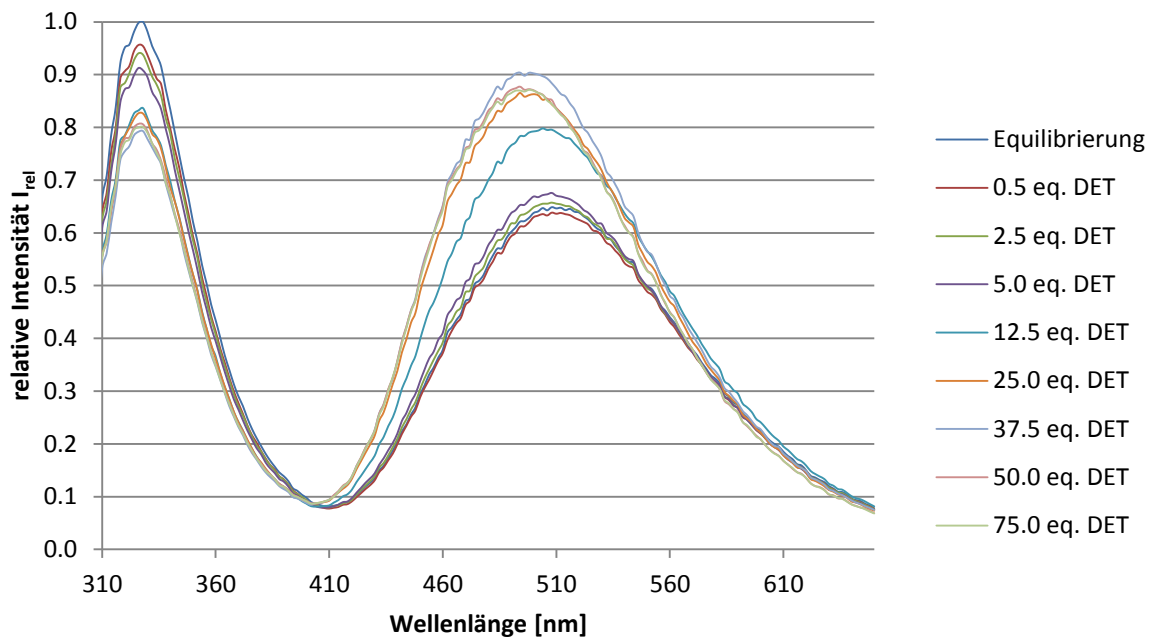


Abbildung 207: Titration mit 0.0 eq. - 75.0 eq. DET (je 2.5 % **66** und **67** in 90 % DMPC - 10 % DPPC) - relative Intensitätsänderung I_{rel} .

Hierzu wurden **66**- und **67**-dotierte Liposomen mit einer steigenden Konzentration des Botenstoffs DET versetzt (1 eq.-75 eq.) (Abbildung 207). Aus der Abnahme der Fluoreszenz-Donor-Intensitäten wurde die Effizienz der Energieübertragung bestimmt (Abbildung 208). Die maximale Energieübertragung, bezogen auf die Abnahme der Donor-Intensität, lag bei Verwendung von 100 eq. DET bei 20 %. In diesem Experiment konnte ermittelt werden, dass die maximale Signalleitung bereits durch Zugabe von 30 eq. DET erreicht werden kann. Eine weitere sukzessive Erhöhung der Botenstoffkonzentration hat keinen weiteren Einfluss auf die Signaltransduktion. Theoretisch denkbar wäre eine Abnahme der Signalleitung bei hohen Konzentrationen des Botenstoffs DET, da bei einem großen Überschuss alle chelatartigen, ternären Komplexe aus **66**-DET-**67** aufgebrochen werden könnten und es zur Ausbildung von 1:1-Komplexen aus den Transmembranbausteinen und DET führen würde. Die Bindungskonstante für den ternären Komplex liegt in gepufferter wässriger Lösung im niedrigen millimolaren Bereich. Zudem sollte für die Bindung des Bo-

tenstoff an der Oberfläche einer Membran, auf Grundlage der *Hunter'schen* Ergebnisse, ein höher koordinierter Bindungsmodus bezüglich des Botenstoffs präferiert sein.^[146]

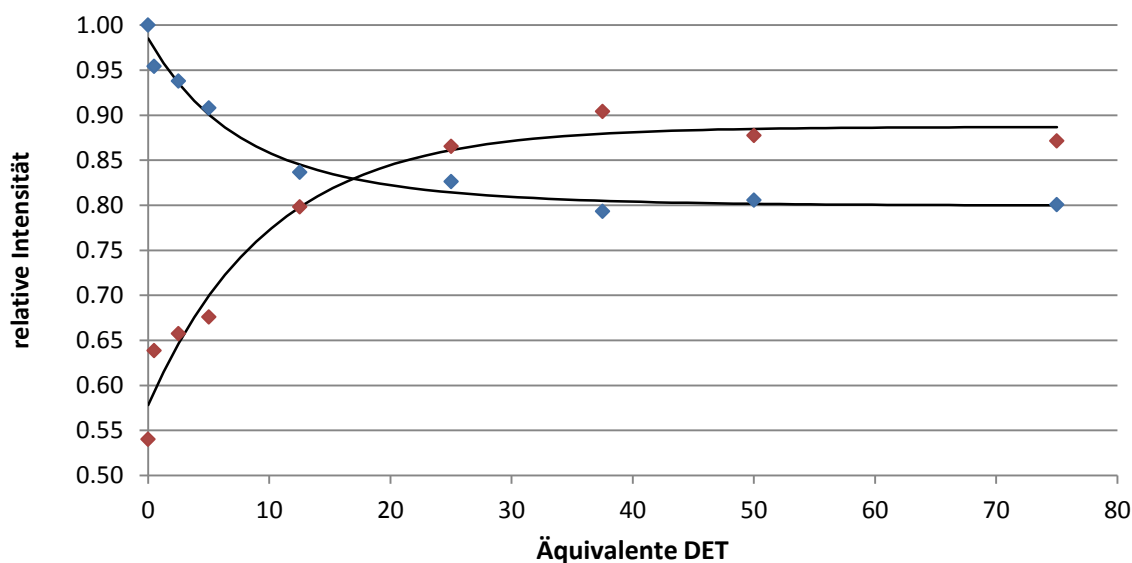


Abbildung 208: Intensitäten der Emissionsmaxima nach Zugabe von 0.0 eq. - 75.0 eq. DET (je 2.5 % 66 und 67 in 90 % DMPC - 10 % DPPC).

Die mit 30 eq. notwendige Konzentration an DET könnte durch eine, bei der Bestimmung der Phasenübergangstemperaturen, gemachte Beobachtung zu erklären sein. Es konnte bei den Bestimmungen der Phasenübergangstemperaturen T_c beobachtet werden, dass die Einlagerung der bisphosphonatgelabelten Transmembranbausteine **76** und **90** zu einer Erhöhung der Phasenübergangstemperaturen führt. Als möglicher Grund hierfür kommt eine Komplexierung der Cholinkopfgruppe der verwendeten Lipide durch die Bisphosphonat-Erkennungseinheit in Betracht. Dieser Effekt könnte ebenfalls die notwendige erhöhte Konzentration an DET erklären, da im Fall der zuvor gemachten Annahme, zuerst die Komplexe aus der Cholinkopfgruppe und den Erkennungseinheiten aufgebrochen werden müssten.

3.4.13 Verwendung anderer Botenstoffe

Um weitere, zur Signaltransduktion befähigte Botenstoffe zu identifizieren bzw. eine Selektivität für einen bestimmten Botenstoff für das System zu untersuchen, wurden einige biogene Amine und nicht natürlich vorkommende Amine getestet. Als weitere, neben dem DET nichtbiogene Amine, wurden Ethylendiamin (**113**) und Tris(2-aminoethyl)amin (**114**) getestet (Abbildung 209). Für beide potentielle Botenstoffe konnte annähernd die gleiche Signalübertragung für das System **66**-und **67** in DMPC/DPPC-Liposomen detektiert werden. Die natürlich vorkommenden Polyamine Spermidin (**115**), Spermin (**116**), Tetralysin (**117**),

Diarginin (**118**), Triarginin (**119**) und Tetraarginin (**120**) konnten keinen Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer induzieren (Abbildung 209/210).

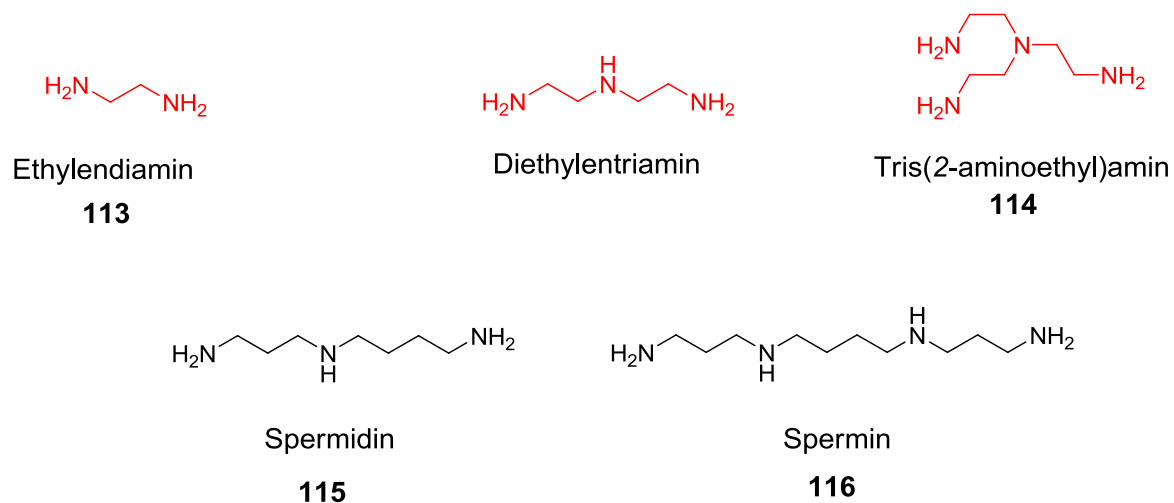


Abbildung 209: Botenstoffe I.

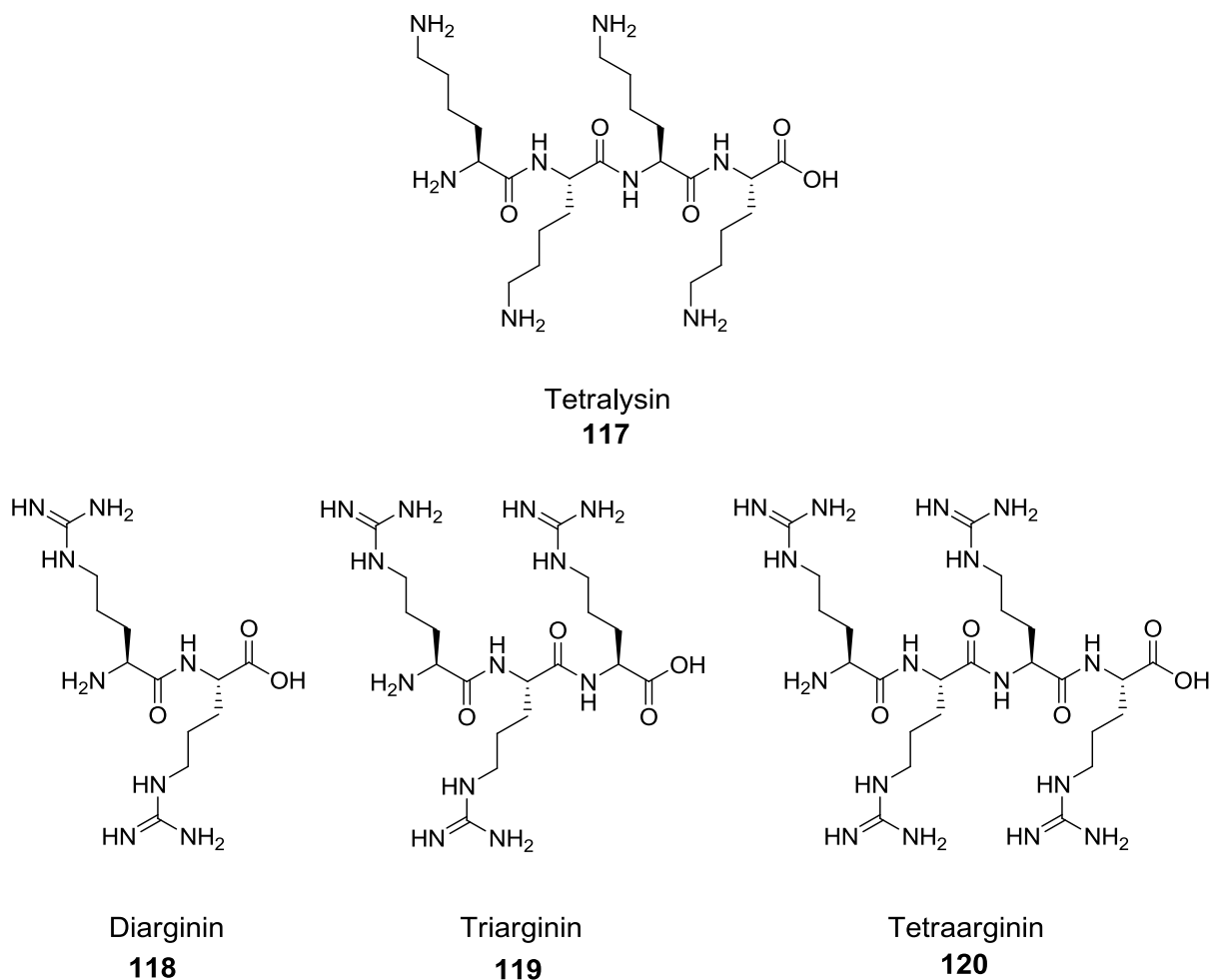


Abbildung 210: Botenstoffe II.

Die Selektivität für die kleinen, kompakten Botenstoffmoleküle kann durch den relativ geringen Försterradius (2.1 nm) der beiden verwendeten Fluorophore begründet werden.

Für die verwendeten biogenen Polyamine **115 – 120** führt die Komplexierung zweier Bisphosphonatpinzetten nicht zu einer hinreichend geringen Annäherung des FRET-Paares Tryptophan/Dansyl auf der Innenseite der Membran. Alle Polyamine, ausgenommen der nicht natürlich vorkommenden, besitzen einen relativ großen van-der-Waals-Radius, die Polyaminosäuren zudem noch flexible Seitenketten mit Aminokopfgruppe. Auch wenn es für alle eingesetzten Botenstoffe zu einer Komplexierung durch die BisphosphonatEinheiten kommt, weist dieses System eine Selektivität für kleine Botenstoffe auf, die zur Ausbildung kompakter, ternärer Komplexe befähigt sind.

Als positiver Nebeneffekt sind alle induzierenden Botenstoffe nicht natürlich, was eventuell für später denkbare Untersuchungen in natürlichen Systemen ein großer Vorteil ist.

3.5 Signaltransduktionsexperimente mit den Rezeptoren 67 und 121

Um die erfolgreichen Ergebnisse aus Kapitel 3.4 zu überprüfen und die erfolgreiche gerichtete künstliche Signaltransduktion in einem unabhängigen System nachzuweisen, sollte ein weiteres Rezeptorpaar aufgebaut werden, welches einen Transmembranrezeptor beinhaltet, der anstelle eines fluoreszierenden FRET-Akzeptors mit einen Fluoreszenzquencher funktionalisiert ist. Der Vorteil, den die Verwendung eines Quenchers im Gegensatz zu einem fluoreszierenden Akzeptor bietet, besteht darin, dass keine Hintergrundfluoreszenz auftritt, die entweder aus einer direkten Anregung des Akzeptors, wie im Falle der Rezeptoren 66 und 67 beobachtet, oder einer Reemission herrühren kann.

Als Fluoreszenzlöcher finden organische Moleküle, aber auch Metalle wie Gold und Metallnanopartikel Verwendung. Viele der organischen Fluoreszenzlöcher sind kommerziell erhältlich. So z.B., das bereits in Kapitel 4.4.9 bei der Synthese des unsymmetrischen Transmembranbausteins **110** verwendete Dabcyl **109** (4-(4'-Dimethylaminophenylazo)-benzoesäure). Dieser am häufigsten verwendete Quencher besitzt ein Absorptionsmaximum bei 485 nm und absorbiert über einen breiten Wellenlängenbereich, so dass der Einsatz unterschiedlichster Fluoreszenz-Donor-Moleküle möglich ist. Um den synthetischen Mehraufwand gering zu halten, soll als FRET-Donor, der bereits synthetisierte und erfolgreich eingesetzte dansylgelabelte Rezeptor **67** zum Einsatz kommen.

In Abbildung 211 ist das modifizierte Signaltransduktionssystem mit den Donor/Quencher-funktionalisierten Rezeptoren **67** und **121** schematisch dargestellt.

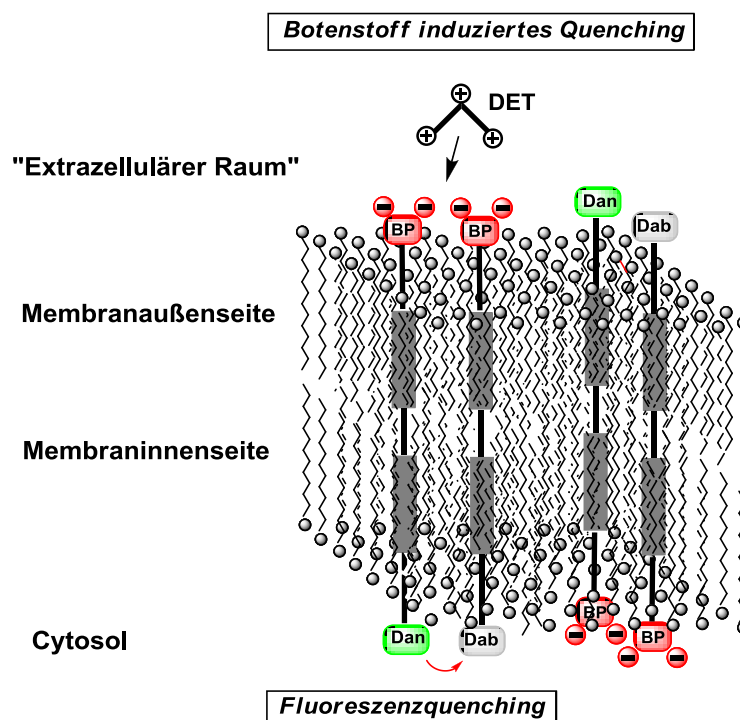


Abbildung 211: Signaltransduktionssystem mit Donor-Quencher-Kombination 67 und 121.

3.5.1 Synthese des Rezeptors 121 mit Quencher-Einheit

Die Synthese des Transmembranbausteins **121** mit Dabcyl-Quencher-Einheit erfolgte weitgehend nach den bereits bekannten Syntheseprotokollen (Kapitel 3.2 und 3.4.8.2). Für die Anknüpfung des Farbstoffs an das Transmembranzentralsegment **65** wurde der kom-

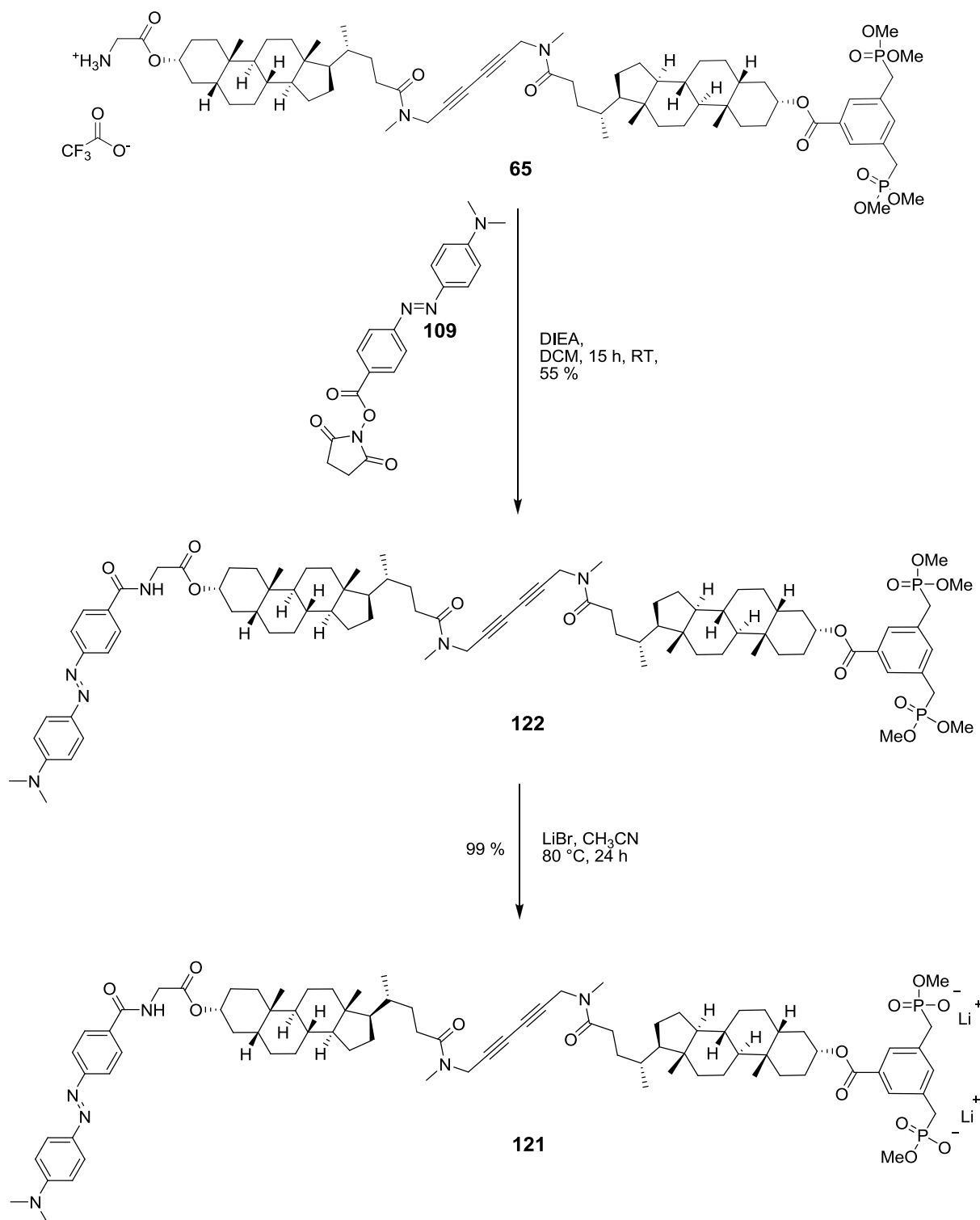


Abbildung 212: Synthese des Transmembranbausteins **121** mit Dabcyl-Quencher-Einheit.

merziell erhältliche *N*-Succinimid-Aktivester **109** eingesetzt. Unter Verwendung von DIEA als Hilfsbase konnte der Baustein **122** in zufriedenstellenden Ausbeuten erhalten werden. Die anschließende Spaltung der Methylphosphonsäureester mit LiBr in Acetonitril lieferte unter quantitativem Umsatz die Zielverbindung **121**. Das ^1H -NMR-Spektrum des Rezeptors **121** ist in Abbildung 213 dargestellt.

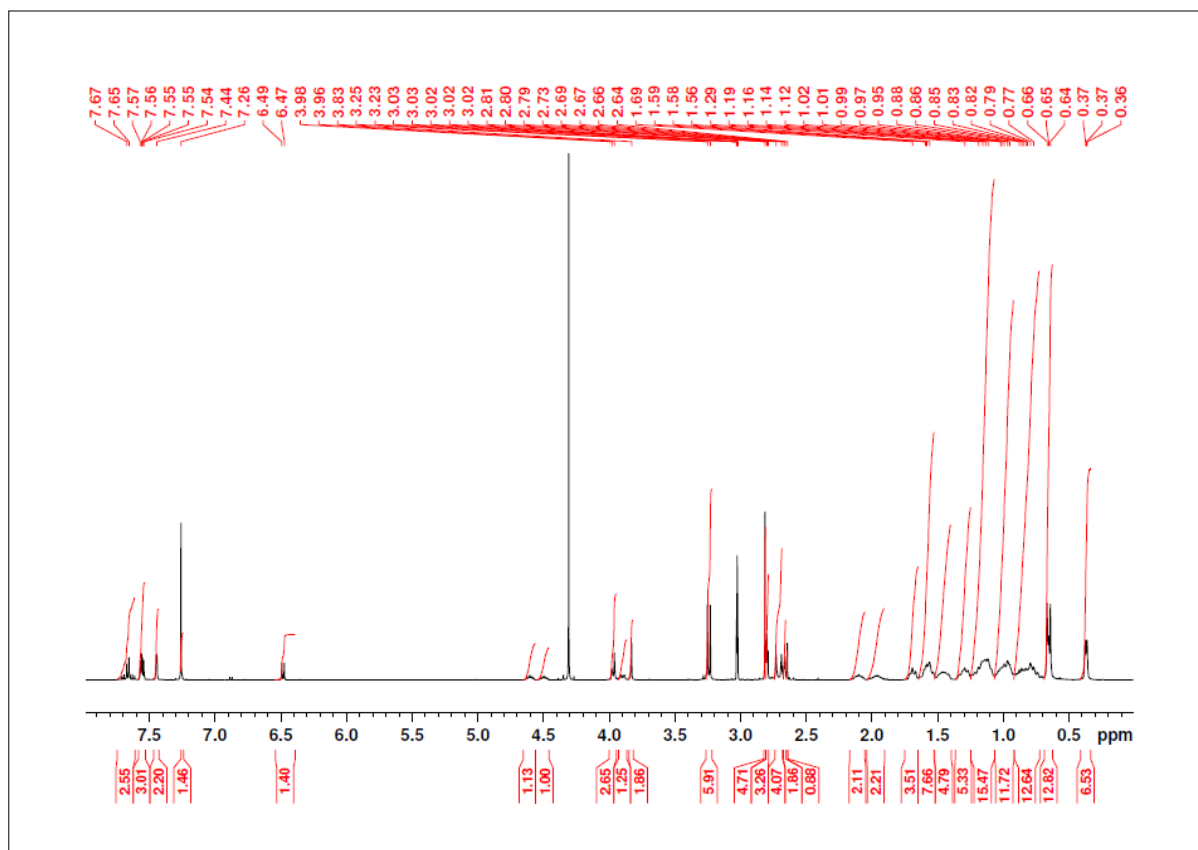


Abbildung 213: ^1H -NMR (500 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}-d_4=2:1$): DabcyI-*N*-glycin-(lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-BP(OLi); **121**.

3.5.2 Signaltransduktionsexperimente mit den Rezeptoren **67** und **121**

Der Aufbau der Signaltransduktionsexperimente wurde analog zu den Experimenten mit den Rezeptoren **66** und **67** durchgeführt. Als Liposomenmaterial wurde wiederum ein Gemisch aus DMPC und DPPC mit einem Verhältnis von 75 % zu 25 % gewählt. Die Präparation der Liposomen erfolgte nach dem etablierten Verfahren (3.3.3.2). Im Vorfeld wurden die Absorptions- und Emissionsspektren des Rezeptors **121** in Methanol aufgenommen, um im direkten Vergleich mit den Spektren des Rezeptors **67** die Größe des Überlappungsintegrals $J(1)$ abschätzen zu können. Abbildung 214 zeigt die normalisierten Intensitäten des FRET-Donors **67** und des FRET-Quenchers **121**. Es konnte bestätigt werden, dass für die Donor-Quencher-Kombination ein breites Überlappungsintegral $J(1)$ zwischen der Donor-

Emission und der Quencher-Absorption vorliegt. Zudem ist keine Eigenfluoreszenz des Rezeptors **121** in methanolischer Lösung zu beobachten.

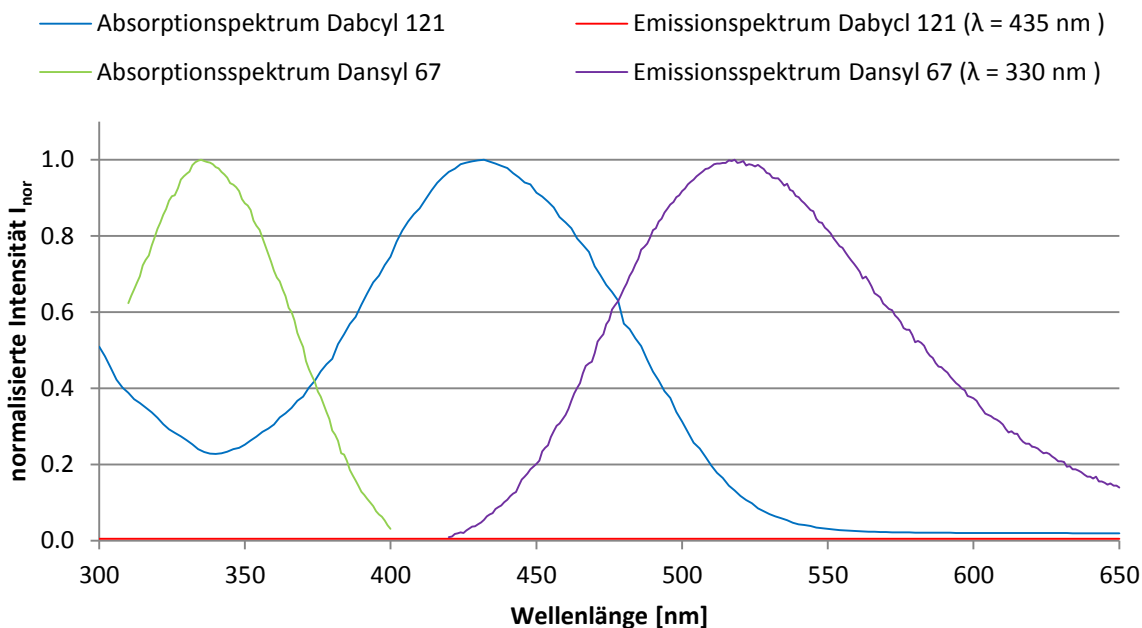


Abbildung 214: Absorptions- und Emissionsspektren der Transmembranbausteine **67** und **121** ($c = 10^{-4}$ mol/L in MeOH).

In den Signaltransduktionsexperimenten wurden die Liposomen mit je 2.0 % - 3.0 % der Transmembranbausteine **67** und **121** dotiert. Zudem wurden die bereits für das System **66/67** getesteten Polyamine **113** - **120** als potentielle Botenstoffe untersucht. Die besten Ergebnisse konnten für das System **66-TREN-121** mit einer Dotierung von je 2.5 % erhalten werden. Die maximal induzierbare Signalleitung, bezogen auf die Abnahme der Dansyl-

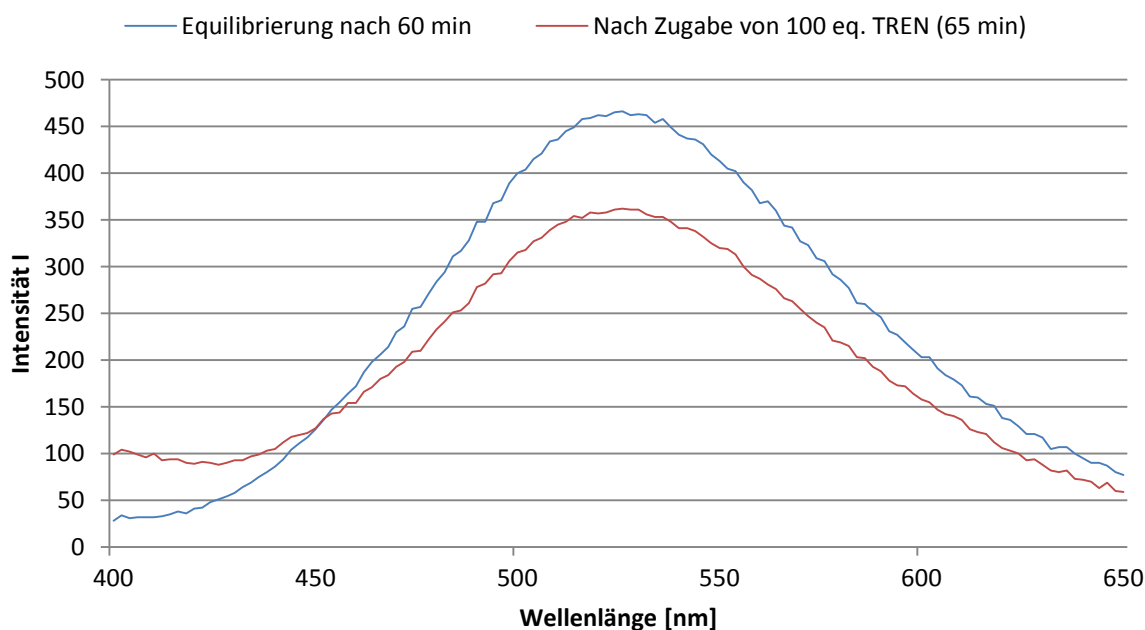


Abbildung 215: Emissionsspektren vor und nach Zugabe von 100 eq. TREN (**114**) (5 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %).

Emission beträgt auch für dieses System 20 %. Für Dotierungen mit je 2.0 % und 3.0 % fiel die Signalübertragung niedriger aus. Dieses war für das modifizierte System **67/121** so nicht unbedingt zu erwarten, da der Försterradius mit 3.0 nm um 0.9 nm größer ist, als für das System **66/67** (2.1 nm). Somit ist der permanente Energie Transfer bei gleicher Dotierung und statistischer Verteilung der Rezeptoren **67** und **121** in der Membran im Vergleich zu den Rezeptoren **66/67** geringer. Eine mögliche Ursache für das geringere, induzierbare Signal bei einer Dotierung von je 3 % liegt in der, mit der Erhöhung der Dotierung verbundenen Erhöhung des permanenten FRET-Effekts zwischen **67** und **121**.

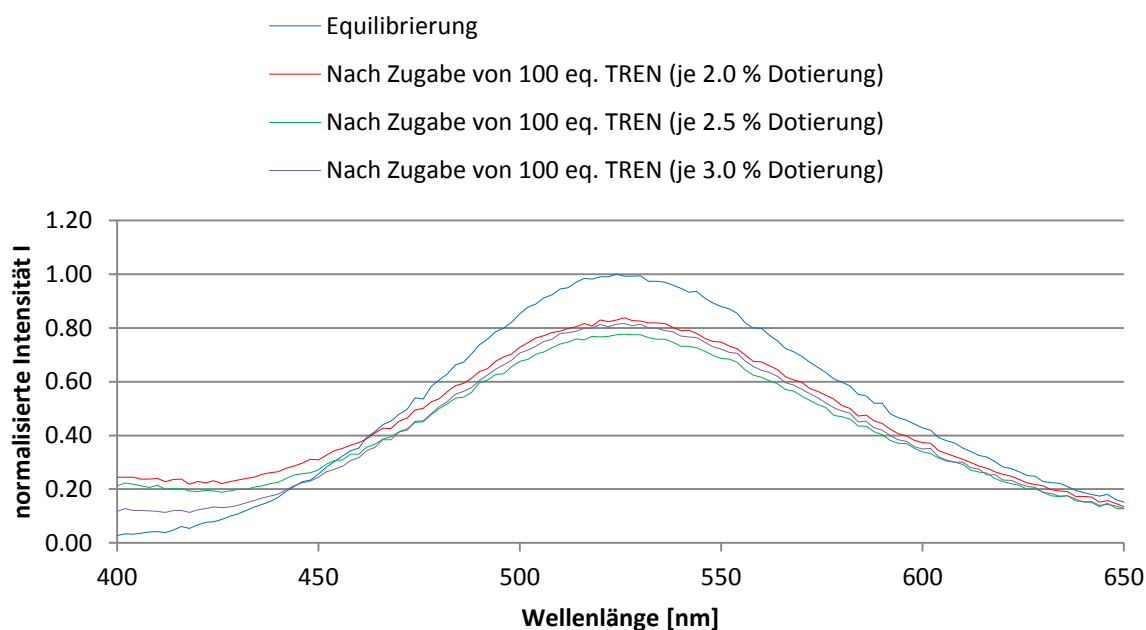


Abbildung 216: Vergleich der unterschiedlichen Dotierungen (2.0 %-3.0 %) mit 100 eq. TREN (**114**) als Botenstoff.

Allerdings kann für das System **67** und **121** eine andere Selektivität bezüglich der verwendeten Botenstoffe festgestellt werden. Die biogenen Amine **115/116** und Peptide **117-120** konnten auch bei diesem System (je 3.0 % in DMPC/DPPC = 75 : 25) kein detektierbares Signal induzieren.

Ein signifikanter Unterschied ist allerdings bei den nicht natürlichen Polyaminen EDA (**113**), DET und TREN (**114**) zu beobachten (Abbildung 217). Bei Zugabe von DET als Botenstoff ist, im Gegensatz zum System **66/67**, kein induziertes Signal zu beobachten. Dies lässt sich auf den erhöhten Försterradius von 3.0 nm zurückführen. In diesem Fall scheint das DET als Botenstoff nicht in der Lage zu sein, einen hinreichend kompakten ternären Komplex **67-DET-121** auszubilden. Die Zugabe des kompakteren EDA (**113**) führt zu einer Abnahme der Dansyl-Donor-Fluoreszenz von etwa 10 %. Die deutlich gesteigerte Signalleitung (20 %) durch Zugabe des Botenstoffs TREN (**114**) muss somit auf die weitere Bindungsstelle des Liganden und die nochmals kompaktere Anordnung der primären Amin-

Funktionen zurückzuführen sein. Theoretisch denkbar ist, dass nach Ausbildung eines produktiven ternären Komplexes **67-TREN-121**, statistisch ein weiterer Rezeptor **121** mit Quencher-Funktion angelagert werden kann.

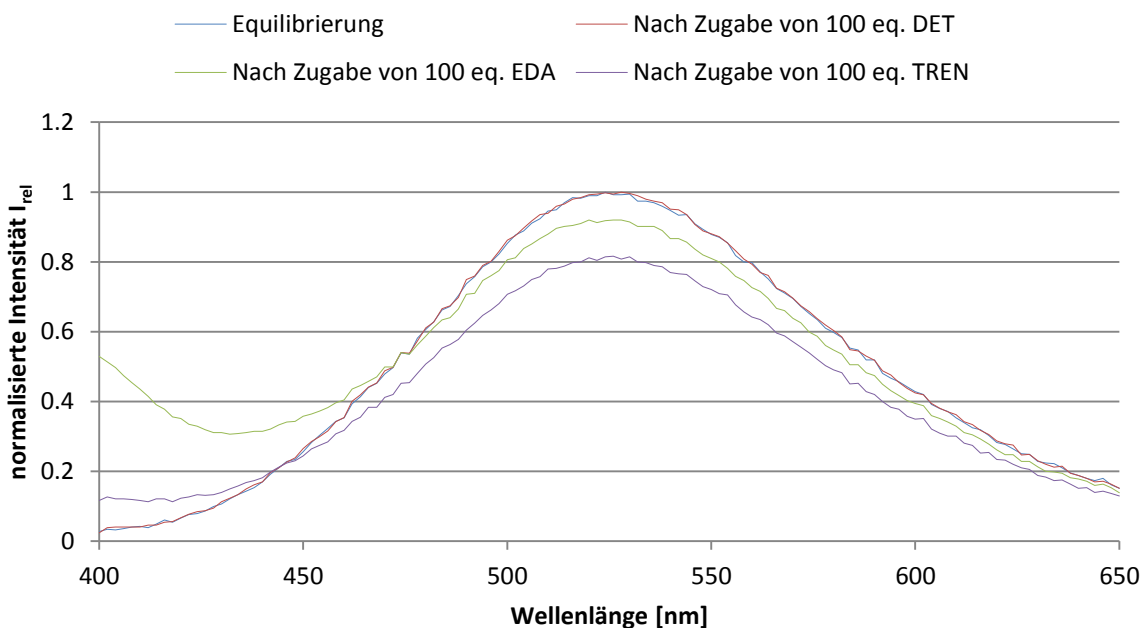


Abbildung 217: Vergleich der unterschiedlichen Botenstoffe (Dotierung je 3,0 %).

Die Ausbildung eines solchen quartären Komplexes **67-TREN-121-121** führt zu einer weiteren Energieübertragung des Donors **67** auf den angelagerten Quencher **121**.

Zudem kann aus den mit den Rezeptoren **67** und **121** erzielten Ergebnissen ein weiterer interessanter Schluss gezogen werden. Die Messungen mit Dansyl- und Dabcyl-gelabelten Transmembranbaustein **110** konnten keine Erkenntnisse bezüglich der Einlageungsgeometrie von Transmembranbausteinen auf Basis eines dimeren Lithocholsäure-Gerüst liefern, da wahrscheinlich durch aromatische und hydrophobe Wechselwirkungen bedingt, die Bildung von Molekül-Clustern des Rezeptors **110** gefördert wird. Im vorliegenden System tritt dieser Effekt, durch Vergleich der absoluten Fluoreszenzintensitäten I ermittelt, nicht oder nur in einem geringen Maße auf, obwohl das gleiche Transmembrangerüst und die gleichen Fluorophore eingesetzt wurden.

Somit kann ein wichtiger Hinweis erhalten werden, dass die Bisphosphonat-Erkennungseinheiten durch die wechselseitige elektrostatische Abstoßung tatsächlich in der Lage sind, hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den den Transmembransegmenten zu minimieren und somit eine botenstoff-induzierte Signaltransduktion zu ermöglichen.

3.6 Signaltransduktionsexperimente mit dem Rezeptor 123

Durch die Experimente mit den Rezeptoren **66** und **67** bzw. **67** und **121** konnte gezeigt werden, dass der Fluoreszenz-Energie-Transfer zwischen zwei Fluorophoren einen geeigneten Readout darstellt, um mit Hilfe von Rezeptoren, die auf dem Transmembrangrundgerüst **65** basieren, botenstoff-induziert, Signale über eine Doppelmembran zu leiten.

Aufgrund der statistischen Einlagerung der eingesetzten Rezeptoren, die mit zwei unterschiedlichen Fluorophoren funktionalisiert sind, ist nur ein Drittel der eingelagerten Rezeptoren zu einer gerichteten transmembranen Signaltransduktion befähigt. Zur Erhöhung der Signalübertragung sollte im Folgenden eine weitere Generation eines fluoreszenzgelabelten Transmembranrezeptors synthetisiert werden. Die Transmembraneinheit **65** soll hierfür mit einem Pyren-Derivat funktionalisiert werden, welches bei geringem räumlichen Abstand, analog zu Fluorecein **124**, zur Ausbildung von Excimeren (*engl. excited dimer*) befähigt ist, die eine, von den Monomeren verschiedene Fluoreszenz-Emissionswellenlänge aufweisen (Abbildung 219). Durch die Verwendung von Pyren-Derivaten als Fluoreszenz-

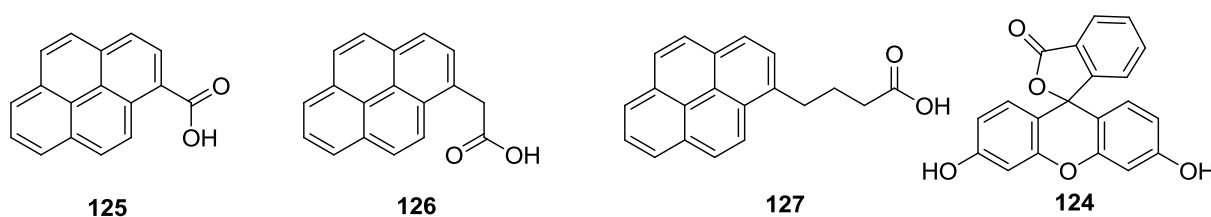


Abbildung 218: Zur Funktionalisierung der Transmembraneinheit 65 vorgesehene Pyren-Derivate 125, 126, 127 und Fluorescein 124.

Farbstoff kann die Anzahl an produktiven Dimeren, welche zu einer detektierbaren Signalübertragung befähigt sind, auf 50 % erhöht werden. Als Excimerbildung bezeichnet man einen konzentrationsabhängigen, bzw. auf räumlichen Abstand basierenden Prozess, der zu Ausbildung angeregter Dimere führt. Excimer-Fluoreszenz liegt im Gegensatz zu Grundzustands-Dimeren nur im angeregten Zustand vor. Wechselwirkungen zwischen einem angeregtem Monomer M^* und einem, sich im elektronischen Grundzustand befindlichen Monomer M führen zur Bildung von Excimeren D . Dimere im Grundzustand sind instabil, da bei immer geringeren räumlichen Abständen die potentielle Energie der gebildeten Dimere zunimmt. Befindet sich allerdings eines, der an Dimerbildung beteiligten Monomere M im elektronisch angeregten Zustand, so ist das elektronisch angeregte Excimer D stabil, da die Potentialkurve in Abhängigkeit des Abstands ein lokales Minimum aufweist. Durch die Excimerbildung tritt im Fluoreszenzspektrum eine längerwellige Bande auf. Bei niedrigen Konzentrationen bzw. einem großen räumlichen Abstand der Pyrenmoleküle überwiegt die Monomerfluoreszenz. Bei höheren Konzentrationen oder einem verringerten räumlichen

Abstand in einer Doppelmembran, nimmt die Wahrscheinlichkeit für produktive Wechselwirkungen zwischen zwei Monomeren zu (Gleichung 10). Durch die Anwesenheit eines Quencher-moleküls oder eines Pyren-moleküls im elektronischen Grundzustand treten folgende Desaktivierungsprozesse mit der Excimerfluoreszenz in Konkurrenz:

Fluoreszenzverschiebung:



Desaktivierungs-Reaktionen:



Die Emissionmaxima der Monomer- bzw. der Excimerfluoreszenz liegen bei 390 nm bzw. 490 nm. Das Absorptionsmaximum liegt bei einer Wellenlänge von 340 nm. Abbildung 219 zeigt die konzentrationsabhängigen Emissionsspektren von 1-Pyren-carbonsäure **125** in Methanol.

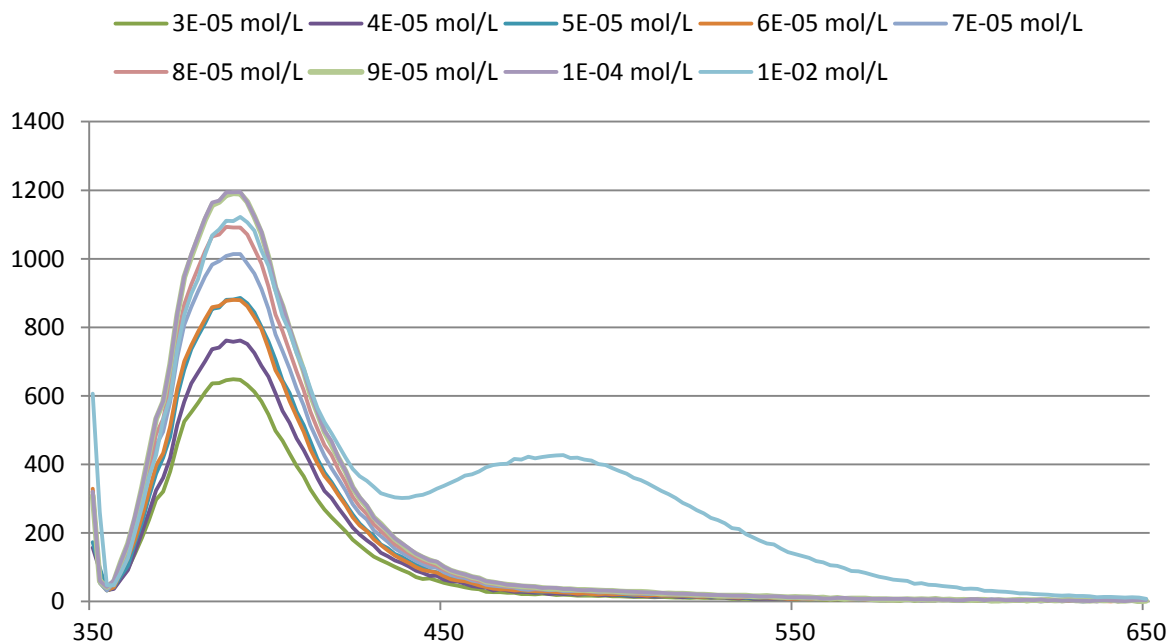


Abbildung 219: Emissionsspektren von **125** ($c = 3 \times 10^{-5} \text{ mol/L} - 10^{-4} \text{ mol/L}$ und 10^{-2} mol/L) in MeOH ($\lambda_{\text{EX}} = 340 \text{ nm}$).

3.6.1 Synthese des Rezeptors 123 mit Pyreneinheit

Um eine möglichst unveränderte Länge des Transmembranbausteins **123** im Vergleich zu den zuvor verwendeten Transmembran-Einheiten zu gewährleisten, sollte 1-Pyrenicarbonsäure **125** an den Glycin-Linker **73** angeknüpft werden (Abbildung 220).

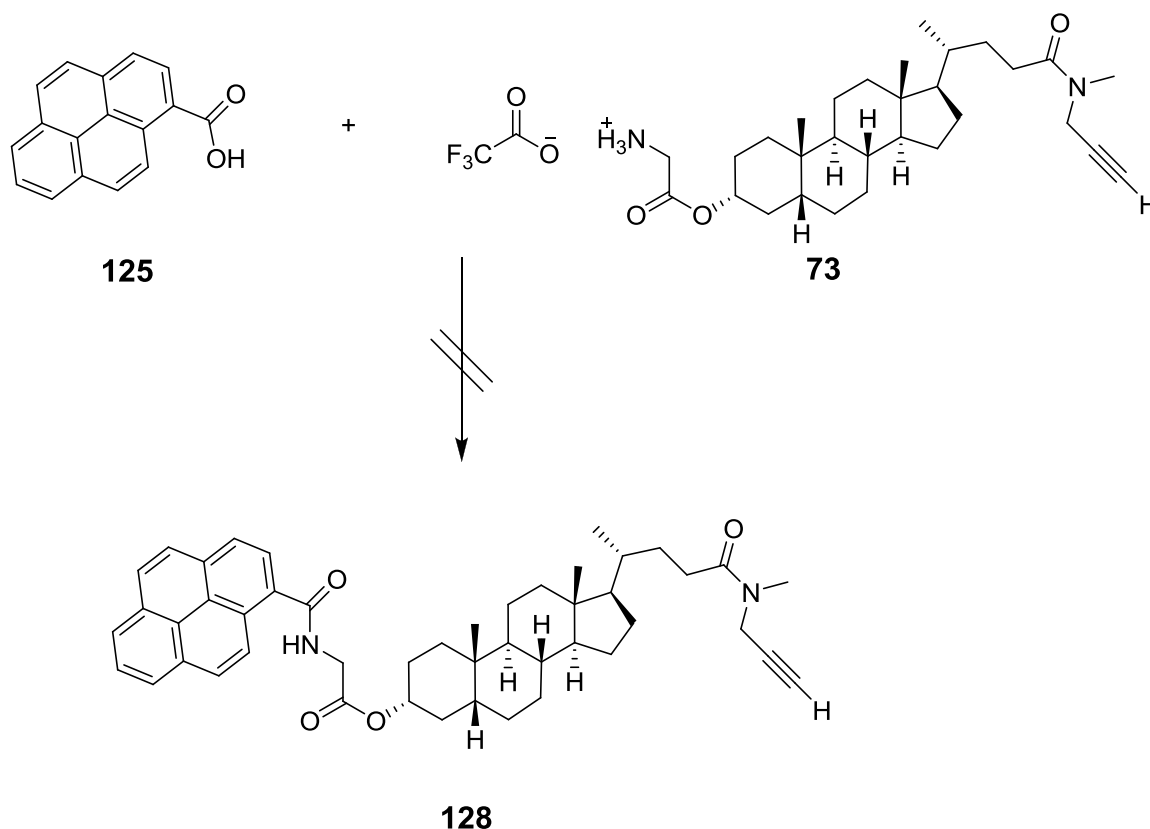


Abbildung 220: Synthese des Transmembransegments **128** mit 1-Pyrenicarbonsäure-Funktion.

Aufgrund der extrem schlechten Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln konnte das Pyrenderivat **125** nach keinem gängigen Peptid-Kupplungsprotokoll mit dem Transmembransegment **73** gekuppelt werden. Als Alternative steht kommerziell erhältliche 1-Pyrenbuttersäure **127** zur Verfügung. Aufgrund des deutlich verlängerten Fluorophor-Spacers sollte 1-Pyrenbuttersäure **127** direkt mit dem Lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Grundgerüst (**71**) verbunden werden. Die Zielverbindung **129** konnte mit HATU in THF und DIEA als Hilfsbase in akzeptablen Ausbeuten erreicht werden (Abbildung 221). Allerdings stellte sich in nachfolgenden Löslichkeitsversuchen heraus, dass der Baustein **129** weder in Methanol, noch in Chloroform löslich ist.

Aus diesem Grund scheidet das Transmembransegment **129** für die spätere Einlagerung in Liposomen, aufgrund der schlechten Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln, aus. Durch die Verwendung von 1-Pyrenessigsäure **126** unter Beibehaltung des Glycin-Spacers erhofften wir uns eine, aufgrund der, im Vergleich zum 1-Pyrenbuttersäure-Derivat **129** zu-

sätzlich vorhandenen Amid-Funktion besseren Löslichkeit des halben Bausteins **130** (Abbildung 222). Die Synthese erfolgte nach dem etablierten HCTU-Protokoll unter Verwendung

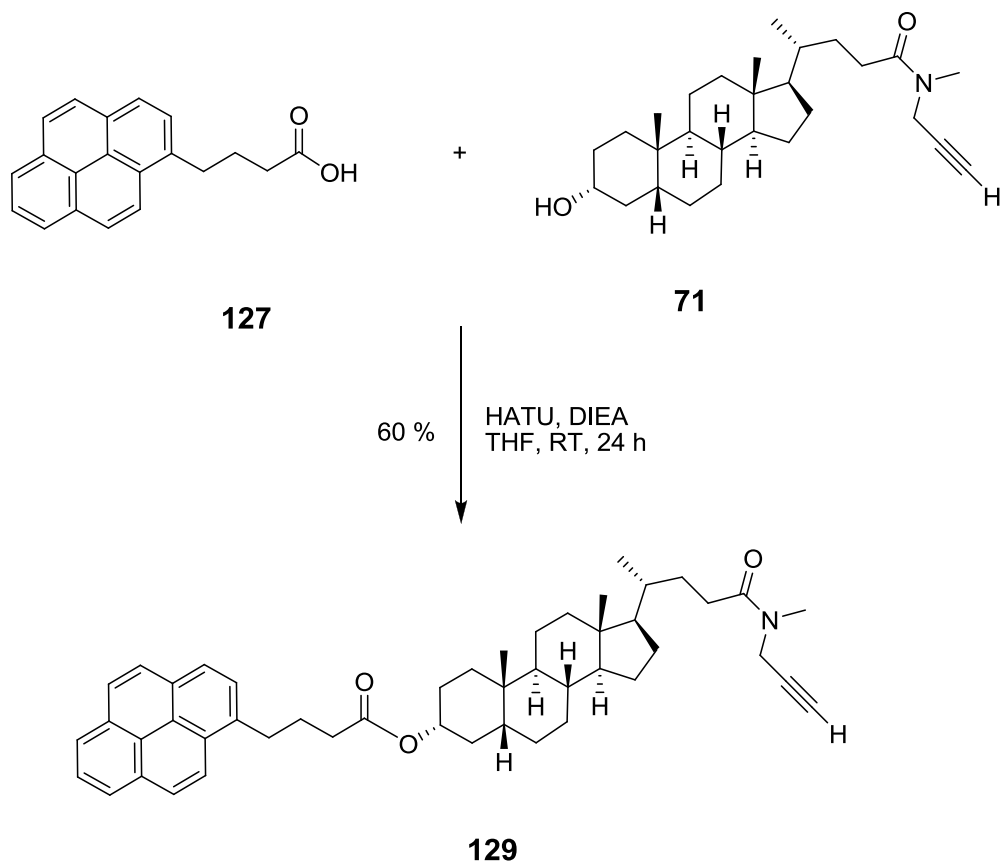


Abbildung 221: Synthese des Transmembransegments 129 mit 1-Pyrenbuttersäure-Einheit.

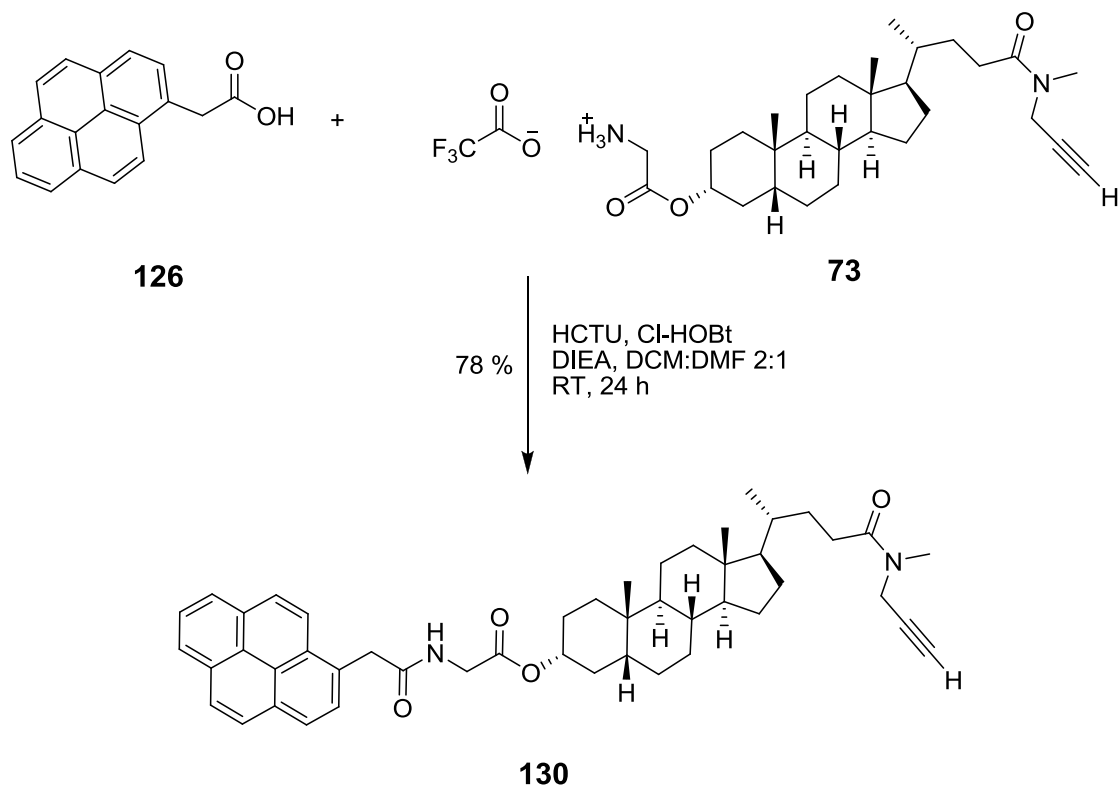


Abbildung 222: Funktionalisierung der Gerüsteinheit 130 mit Pyrenessigsäure.

von Cl-HOBt als Hilfsnukleophil und DIEA als Hilfsbase. Das in guten Ausbeuten isolierte Transmembransegment **130** weist im Gegensatz zu den anderen Pyrenderivaten eine sehr gute Löslichkeit in Chloroform auf. Der Aufbau des dimeren Lithocholsäure-Transmembransegments **131** erfolgte im Gegensatz zu den bisherigen Synthesen nicht durch direkte Kupplung mit der Bisphosphonat-Baustein **75**, sondern mit dem Lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Gerüstbaustein (**71**) über die statistische Glaser-Kupplung.

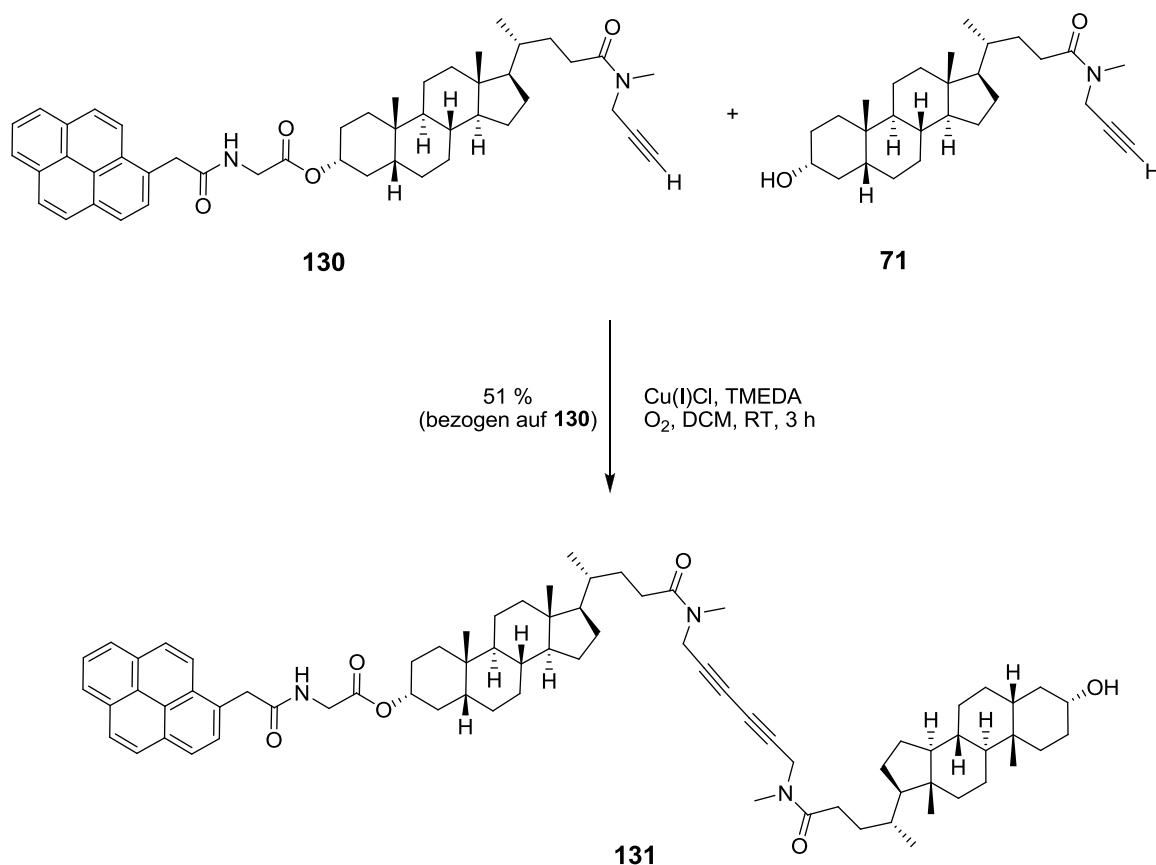


Abbildung 223: Glaser-Kupplung der Lithocholsäure-Derivate **71** und **130**.

Das unsymmetrische Transmembransegment **131** konnte mit einer Ausbeute von 51 % bezogen auf den Pyrenbaustein **130** isoliert werden. Zur Erhöhung der Ausbeute wurde auch in diesem Fall ein Baustein (**71**) im Überschuss eingesetzt (Abbildung 223). Allerdings konnten die drei entstandenen Dimere durch einfache säulenchromatographische Reinigung nicht voneinander getrennt werden. Um die Isolierung des Gerüstbausteins **131** zu vereinfachen, wurde das Gemisch der Verbindungen **95**, **131** und **132** mit einem Überschuss an Trimethylsilyl-Chlorid versetzt, um die sekundären Alkohol-Funktionen der Bausteine **95** und **131** zu derivatisieren und so eine Trennung aufgrund vergrößerter Polaritätsunterschiede zu ermöglichen (Abbildung 224). Nach erfolgreicher Isolierung der Verbindung **133** sollte die TMS-Schutzgruppe durch Versetzen mit verdünnter Salzsäure und anschließende Extraktion mit einem organischen Lösungsmittel zu bewerkstelligen sein.

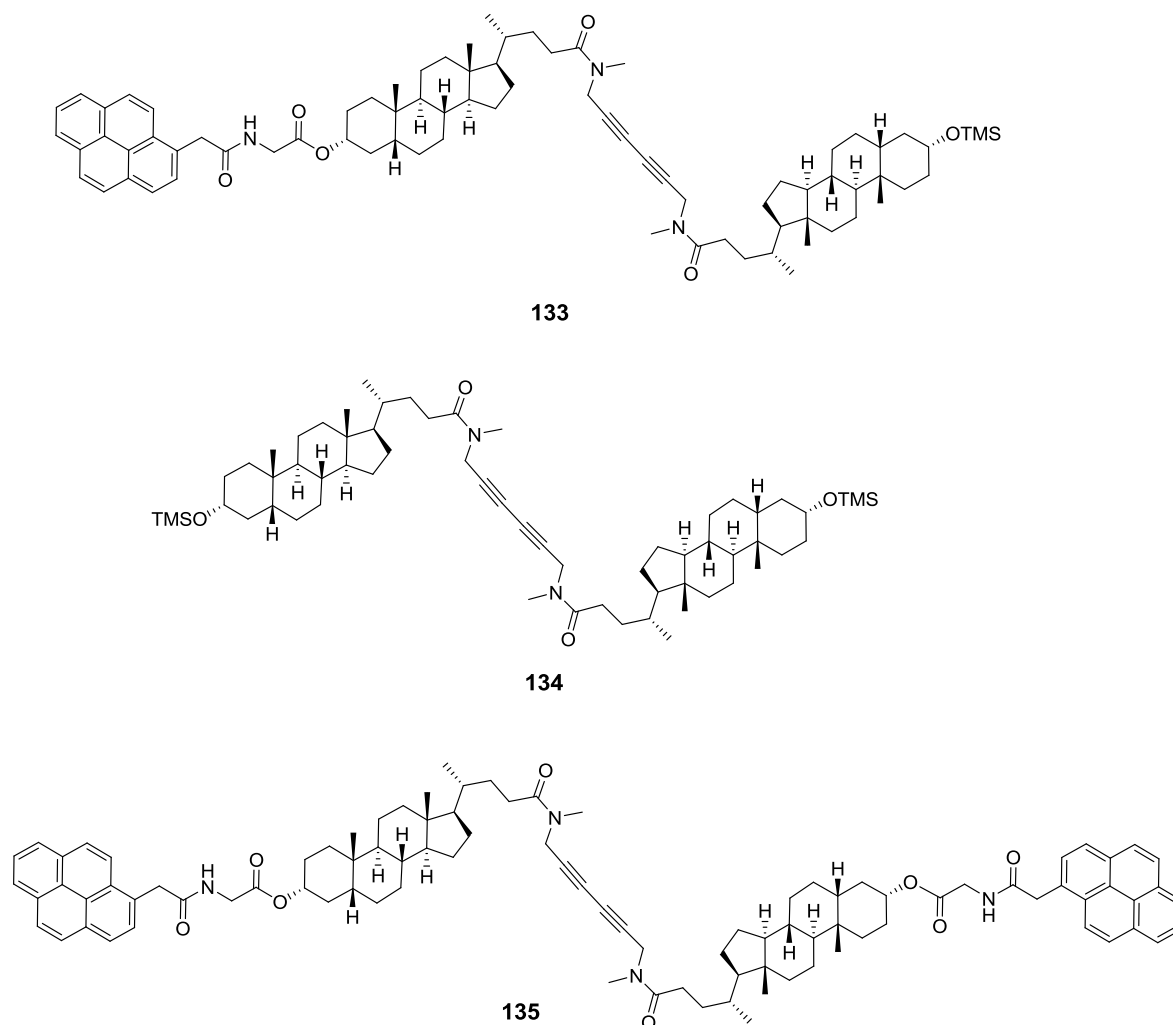


Abbildung 224: Derivatisierung der Kupplungsprodukte 95 und 131 zur säulenchromatographischen Trennung.

Um die Bedingungen für diesen Syntheseschritt zu testen, wurde das Syntheseprotokoll in einer Modellreaktion mit dem Grundbaustein **136** getestet. Lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid (**71**) wurde unter Verwendung von DIEA als Hilfsbase mit einem Überschuss an Trimethylsilyl-Chlorid quantitativ zur Modellverbindung **136** derivatisiert (Abbildung 225) und nach säulenchromatographischer Reinigung (Ausbeute 97 %) in Dichlormethan gelöst und mit 1 M Salzsäure versetzt. Nach mehrmaliger Extraktion mit Dichlormethan konnte der Gerüstbaustein **71** in quantitativer Ausbeute zurückgewonnen werden (Abbildung 225).

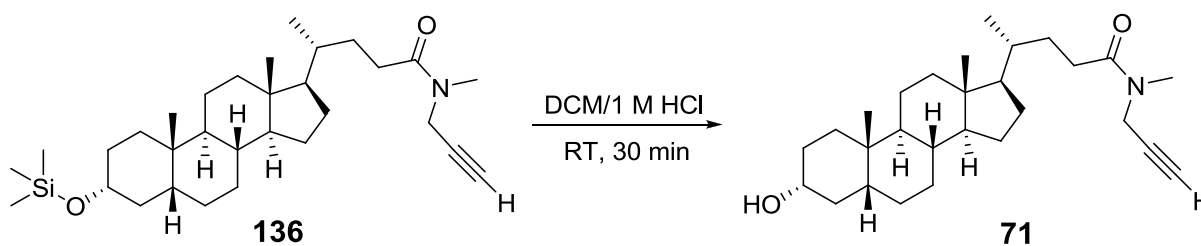


Abbildung 225: Saure Entschützung des Lithocholsäure-Derivats 136.

Das Gemisch aus den drei Dimeren **133**, **134** und **135** wurde im Folgenden mit einem Überschuss an Trimethylsilyl-Chlorid und DIEA versetzt und die vorliegenden Dimere **133**, **134** und **135** säulenchromatographisch getrennt. Die Verbindungen **133** und **135** konnten allerdings nicht vollständig voneinander getrennt werden. Für den nachfolgenden Syntheseschritt, die Änknüpfung der Bisphosphonatpinzette **74**, sollte der Einsatz des Gemischs kein Nachteil sein, da Verbindung **135** keine freie Hydroxy-Funktion aufweist. Das leicht verunreinigte Transmembransegment **133** wurde in Dichlormethan gelöst und anschließend mehrere Male mit 1 M Salzsäure versetzt.

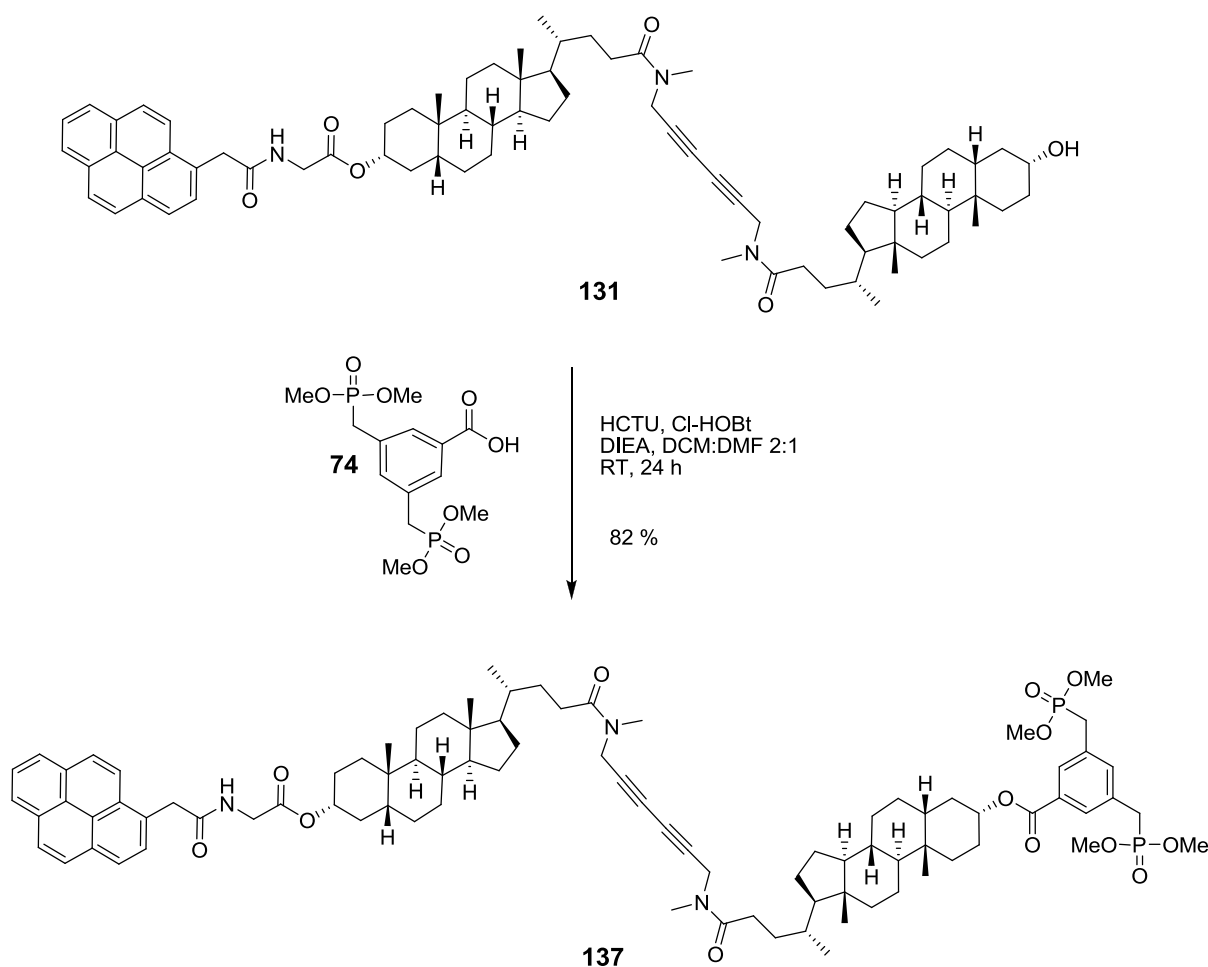


Abbildung 226: Funktionalisierung des Transmembransegments **131** mit der Bisphosphonatpinzette.

Das entschützte Dimer **131** wurde anschließend nach dem etablierten HCTU-Peptid-Kupplungsprotokoll mit der Bisphosphonatpinzette **74** funktionalisiert (Abbildung 226). Der in guten Ausbeuten isolierte Transmembranbaustein **137** wurde anschließend mit Hilfe von LiBr zum Rezeptor **123** entschützt (Abbildung 227). In Abbildung 228 ist das ^1H -NMR-Spektrum des Transmembranrezeptors **123** dargestellt.

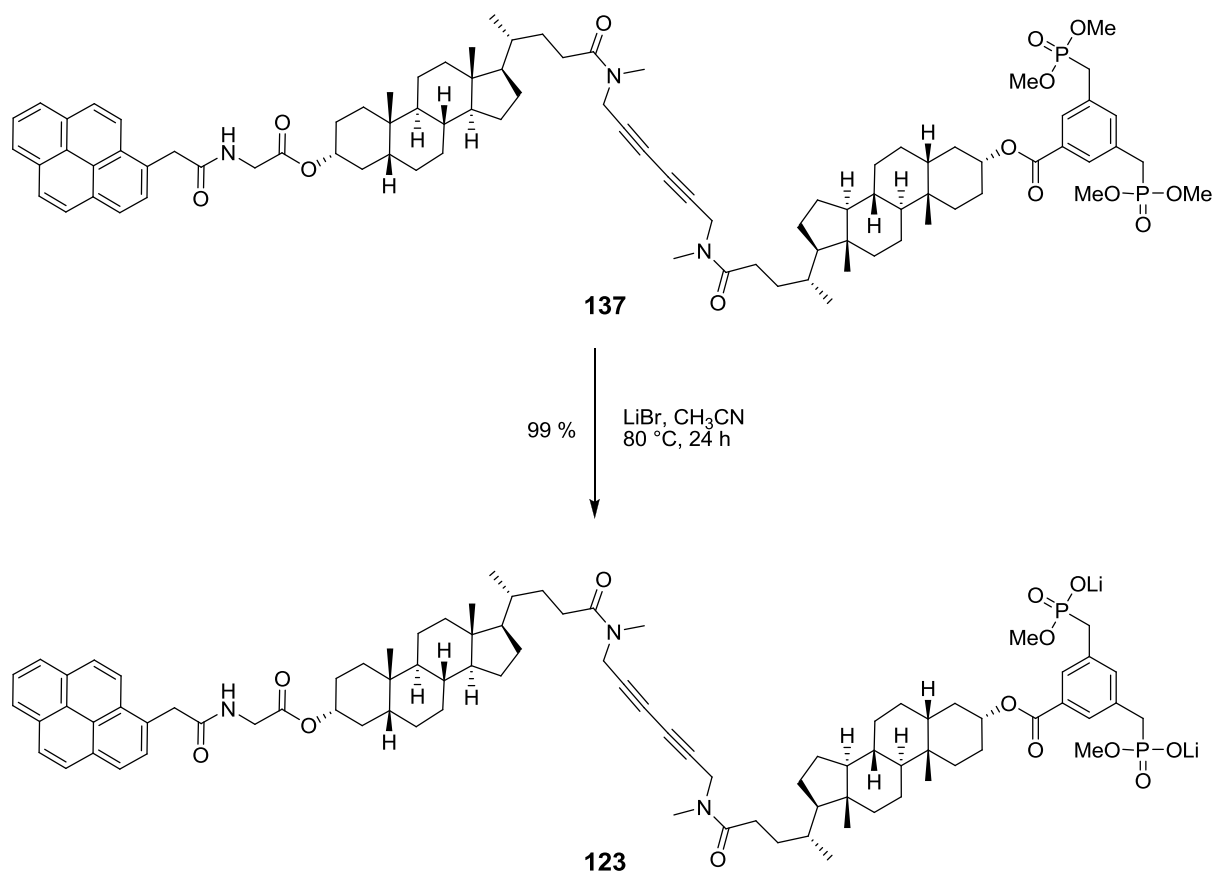


Abbildung 227: Entschützung zum Transmembranrezeptor 137 mit Pyrenfluorophor.

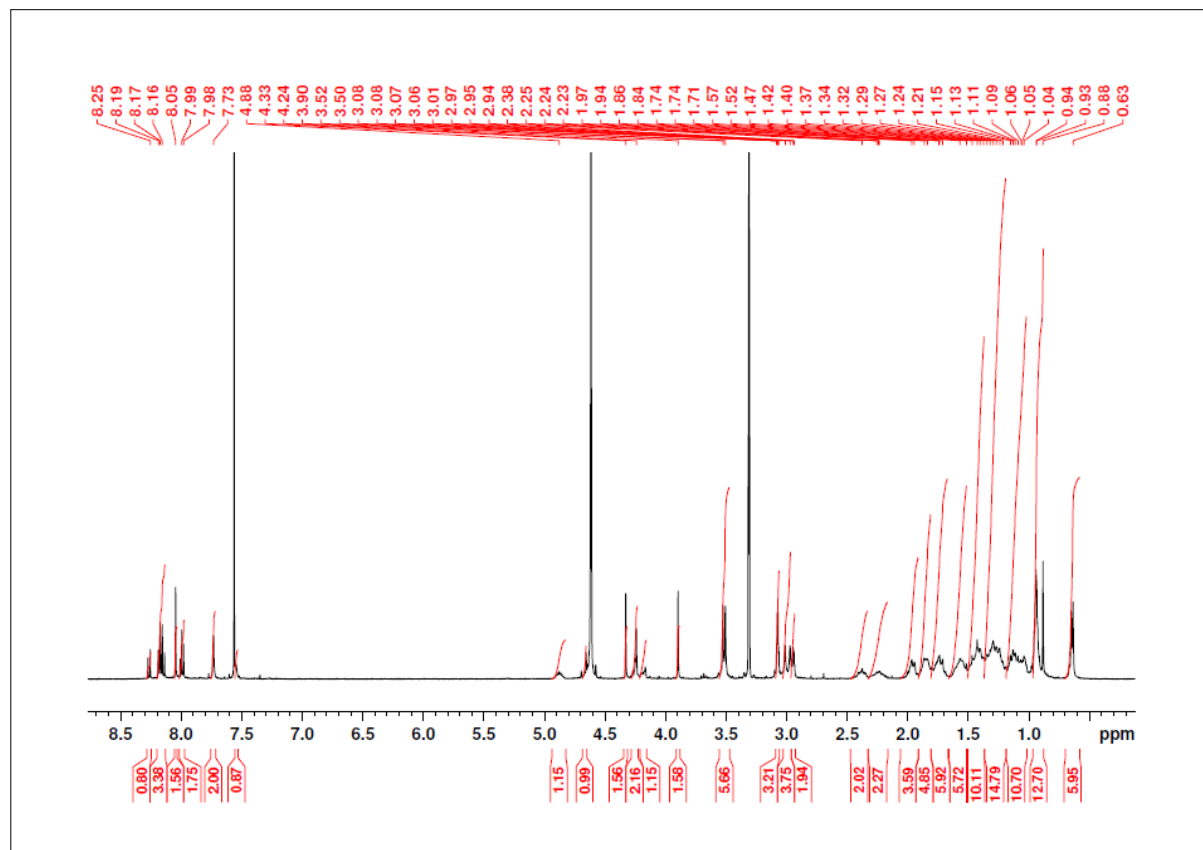


Abbildung 228: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 1-Pyrenessigsäure-N-glycin-(lithocholsäure-N-methylpropargylamid-Dimer)-BP(OLi)₂ 123.

3.6.2 Signaltransduktionsexperimente mit dem Rezeptor 123

Die Signaltransduktionsexperimente mit dem Pyren-gelabelten Rezeptor **123** wurden nach den etablierten Protokollen durchgeführt (3.4.2 und 3.5.2). Allerdings wurden die frisch präparierten Liposomenlösungen mehrere Male entgast und die Fluoreszenzmessungen unter Schutzgasatmosphäre durchgeführt, um die Proben frei von Sauerstoff zu halten, da molekularer Sauerstoff als potentieller Quencher für die Fluoreszenz des gebildeten Excimers fungieren kann. Die postulierte, durch den Botenstoff TREN (**114**) induzierte, Excimerbildung ist schematisch in Abbildung 229 dargestellt. Für die ersten Experimente wurden Liposomen

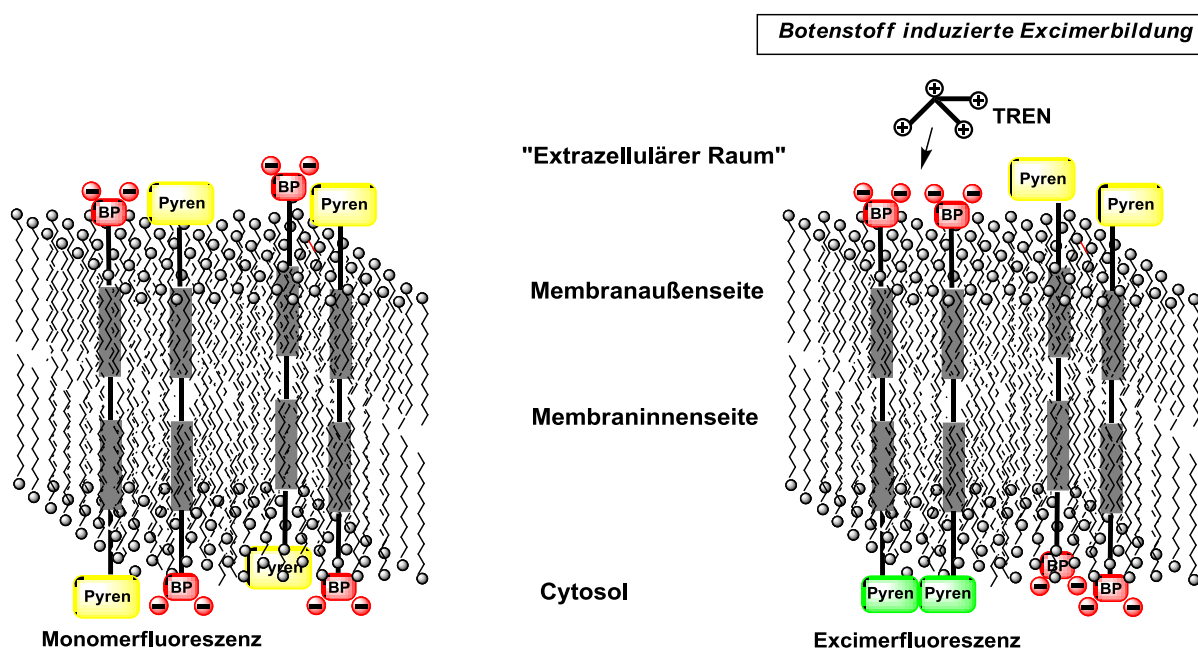


Abbildung 229: Postulierte botenstoff-induzierte Excimerbildung.

somen mit einem Rezeptorgehalt von 5 % präpariert. Die Fluoreszenzemissionsspektren zeigten direkt nach der Präparation der Liposomen die zu erwartende Monomerfluoreszenz bei einer Wellenlänge von 388 nm. Eine, dem permanenten FRET-Effekt der Rezeptoren **66** und **67** entsprechende Excimerfluoreszenz konnte während der Equilibrierungsphase nicht beobachtet werden, so dass sich daraus schließen lässt, dass der räumliche Abstand zwischen den Rezeptoren **123** hinreichend groß ist (Abbildung 230). Auf Zugabe von 100 eq. des Botenstoffs TREN (**114**) konnte ein starker Rückgang der Monomerfluoreszenz um etwa 40 % beobachtet werden. Dieser Rückgang steht im Einklang mit den zu erwartenden Ergebnissen, da bei einer gestreckten Einlagerung, die auch für dieses System präferiert sein sollte, 50 % der Rezeptoren **123** zu einer botenstoff-induzierten Signaltransduktion befähigt sind. Allerdings konnte eine simultan auftretende Excimerfluoreszenz nicht beobachtet werden. Die Intensität bei einer Wellenlänge von 470 nm ist nach Zugabe des primären Botenstoffs **114** unverändert (Abbildung 230). Eine Ausfällung der Liposomen konnte nach Zugabe

des Botenstoffs nicht beobachtet werden. Da die Lösung frei von molekularem Sauerstoff gehalten wurde, kommt auch ein Quenchen der Excimerfluoreszenz als Ursache der unveränderten Intensitätswerte bei 470 nm nicht in Frage.

Entweder sind andere Lösungsprozesse der Excimerfluoreszenz die Ursache für das Ausbleiben der Intensitätsveränderung oder der Botenstoff TREN (**114**) ist nicht in der Lage, die Rezeptoren **123** auf einen hinreichend geringen Abstand innerhalb der Doppelmembran zu bringen. Allerdings sollte in diesem Fall die Monomerfluoreszenz ebenfalls unverändert bleiben. Eine potentielle Wechselwirkung zwischen dem zugesetzten Botenstoff und der Pyren-Einheit, hinsichtlich veränderter Intensitäten an den Emissionsmaxima, konnten in Kontrollexperimenten ausgeschlossen werden.

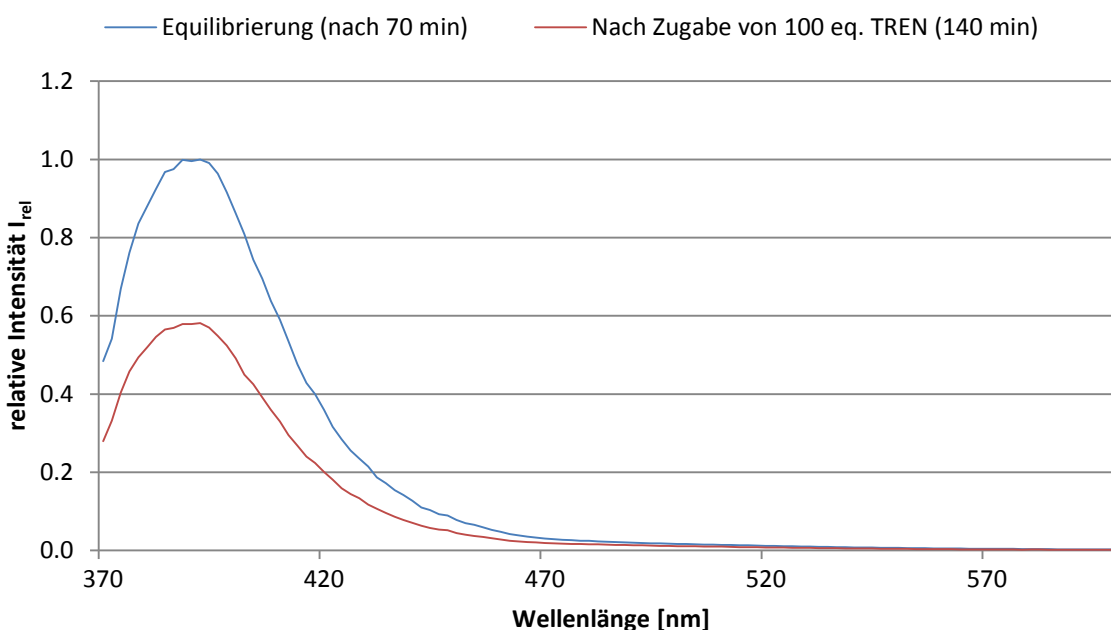


Abbildung 230: Änderung der relativen Intensitäten I_{rel} nach Zugabe von 100 eq. TREN (**114**) (5 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %).

Um einen zu großen Abstand der Bausteine **123** in der Membran nach Zugabe des Botenstoffs ausschließen zu können, wurde die Rezeptorkonzentration in der Membran auf 10 % erhöht und die Signaltransduktionsexperimente in analoger Weise wiederholt (Abbildung 231). Die höhere Dotierung hat, im Vergleich zu den mit 5 % **123**-dotierten Liposomen einen konzentrationsabhängigen Anstieg der Excimerfluoreszenz bereits vor Zugabe des Botenstoffs zu Folge. Somit können Quenching-Prozesse, die zu einem permanenten Quenchen der Excimerfluoreszenz in der Membran führen, ausgeschlossen werden. Die Zugabe von 100 eq TREN (**114**) führt allerdings zu dem bereits zuvor beobachteten Phänomen, dass zwar ein deutlicher Rückgang (47 %) der Monomerfluoreszenz (388 nm) detektiert werden kann, aber ein Anstieg der Excimerfluoreszenz nicht beobachtet werden kann. Diese wird

sogar um 2 % erniedrigt (Abbildung 231).

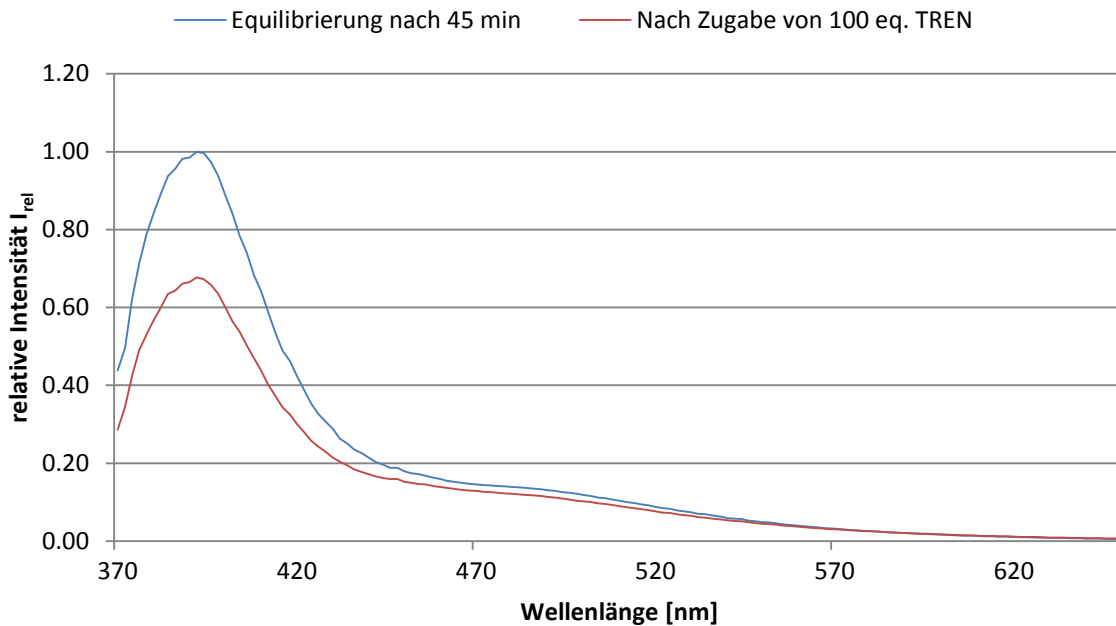


Abbildung 231: Änderung der relativen Intensitäten I_{rel} nach Zugabe von 100 eq. TREN (114) (10 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %).

Da die Fluoreszenzintensitäten I_{rel} über einen großen Wellenlängenbereich abnehmen, wurde zur Überprüfung eventuell auftretender Ausfällungsreaktionen eine Konzentrationsreihe des Rezeptors **123** in DMPC/DPPC-Liposomen aufgenommen und die Monomer- und Excimerfluoreszenzintensitäten I_M und I_E simultan verfolgt (Abbildung 232).

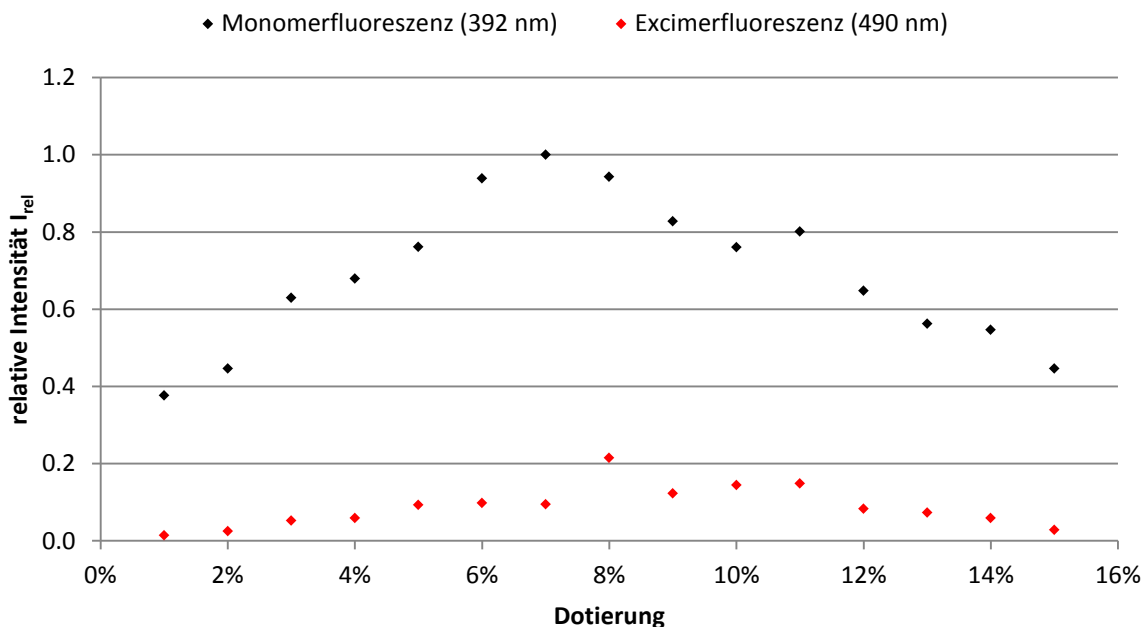


Abbildung 232: Relative Fluoreszenzintensitäten I_{rel} der Monomer- und Eximerfluoreszenz ($\lambda = 392$ nm bzw. $\lambda = 490$ nm) des Rezeptors **123** in DMPC/DPPC-Liposomen.

Diese Untersuchungen zeigten, dass der Rezeptor **123** bis zur einer Dotierung von 7 % vollständig in die Liposomen eingelagert wird. Bei höheren Dotierung der Membran ist

ein simultaner Rückgang sowohl der Monomerfluoreszenz I_M , als auch der Excimerfluoreszenz I_E unter gleichzeitig auftretender Trübung der Lösung zu beobachten. Die Zugabe des Botenstoffs TREN (**114**) oberhalb dieser kritischen Konzentration verstärkt die Ausfällung zudem noch. Somit können aus dem Signaltransduktionsexperiment mit einer Dotierung von 10 % keine aussagekräftigen Ergebnisse gewonnen werden (Abbildung 232).

Im Folgenden sollen die Ergebnisse aus dem ersten Signaltransduktionsexperiment (Dotierung 5 %) genauer betrachtet werden. Über eine Konzentrationsreihe (Abbildung 232) konnte gezeigt werden, dass der Rezeptor **123** bei einer Dotierung der Membran mit 5 % **123** vollständig in die Doppelmembran eingelagert wird. Während der Equilibrierungsphase, vor Zugabe des Botenstoffs TREN (**114**), kann eine intensive Fluoreszenz der angeregten Pyren-Monomere beobachtet werden. Eine, auf einen zu geringen Abstand der Rezeptoren **123** im Liposom auftretende Excimer-Fluoreszenz ist in diesem Konzentrationsbereich nicht zu beobachten. Durch Zugabe des primären Botenstoffs TREN (**114**) kann ein sofortiger Rückgang der Monomer-Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 388 nm detektiert werden. Das detektierte Löschen der Fluoreszenz-Intensität I_M liegt mit etwa 47 % in dem Bereich, der für dieses Rezeptorsystem zu erwarten ist, da bei einer vollständigen Komplexierung der extrazellulären Bisphosphonat-Erkennungseinheiten 50 % der Rezeptoren **123**, aufgrund der statistischen Einlagerung in der Doppelmembran zur Bildung produktiver Dimere befähigt sind. Allerdings konnte kein Fluoreszenzemissionsbande detektiert werden, die der Bildung von Excimeren zuzuordnen ist. Durch weitere Kontrollexperimente konnte nachgewiesen werden, dass potentielle Wechselwirkungen mit dem Botenstoff nicht zu einer Desaktivierung der Excimer-Fluoreszenz führen. Quenching-Prozesse durch Wechselwirkungen des Rezeptors **123** mit Fluoreszenz-Quenchern, wie z.B. molekularem Sauerstoff, können aufgrund der gewählten Rahmenbedingungen ebenfalls ausgeschlossen werden. Zudem ist die Excimeremissionsbande bei einer Wellenlänge von etwa 480 nm selbst bei Anwesenheit von molekularem Sauerstoff in methanolischer Lösung zu beobachten (Abbildung 219). Mit den durchgeführten Experimenten ist das Ausbleiben der Excimer-Fluoreszenz nicht zu beantworten. Denkbar ist, dass die Zugabe des Botenstoffs eine Konformationsänderung des Rezeptors **123** in der Membran zur Folge hat, wodurch die umgebungssensitiven Pyren-Einheiten beispielsweise in den hydrophoben Bereich der Doppelmembran umgelagert werden und so ohne eine Verringerung des Pyren-Pyren-Abstandes, ein Löschen der Monomer-Fluoreszenz aufgrund der veränderten Umgebung auftritt. Dieses Löschen könnte eine erfolgreiche Signaltransduktion, die mit den durchgeführten Experimenten nicht eindeutig bewiesen werden kann, vortäuschen.

3.7 Signaltransduktionsexperimente mit den Rezeptoren 138 und 139

Durch die sehr positiven Ergebnisse mit den Modellsystemen **66/67** und **67/121** ermutigt, war das nächste Ziel, die nachgewiesene Signaltransduktion auf ein System zu übertragen, das auf Zugabe eines primären Botenstoffs, an der intrazellulären Seite mit einer chemischen Reaktion unter Abspaltung eines sekundären Botenstoffs reagiert. Ein solches System wurde bereits von *Maue* etabliert.^[173,174] Allerdings konnte für dieses Signaltransduktionssystem der eindeutige Nachweis einer erfolgreichen Signalleitung noch nicht erbracht werden.

Da sich bei der Synthese und den Experimenten mit Rezeptoren **66** und **67/121** bereits gezeigt hatte, dass die Verwendung des Lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Gerüstbausteins **65** eine hydrolysestabile und zur membrandurchspannenden Einlagerung befähigte Zentralregion des Transmembransegments liefert, sollten die Rezeptoren mit freier Thiol, bzw. Disulfidfunktion nach den bereits etablierten Syntheseprotokollen auf dem *N*-Methyl-propargylamid-Derivat **71** aufgebaut werden. Abbildung 233 zeigt die Zielstrukturen der modifizierten Transmembranrezeptoren **138** und **139** nach dem Vorbild von *Maue*. Nach erfolgreicher Synthese sollten die Rezeptoren **138** und **139** mit einer geeigneten Methode, welche die vorzeitige Abreaktion der Disulfidfunktion minimiert, in DMPC/DPPC-Liposomen eingelagert werden und auch für dieses System ein Nachweis der erfolgreichen gerichteten Signaltransduktion, induziert durch einen primären Botenstoff, erbracht werden.

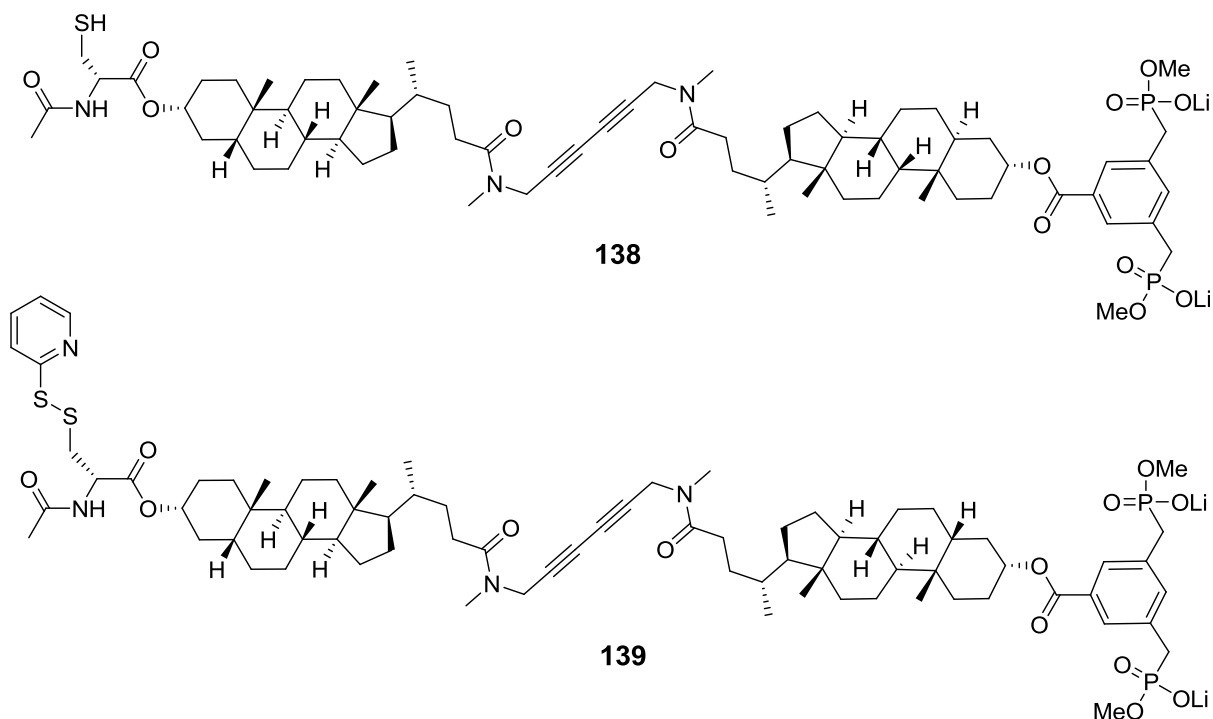


Abbildung 233: Lithocholsäure-N-methylpropargylamid-Analoga 138 und 139 der Transmembranbausteine 59 und 60 nach *Maue*.^[174,176]

3.7.1 Synthese der Rezeptoren 138 und 139

Die Synthese der *Maue'schen* Lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Analoga **138** und **139** erfolgte nach den bereits etablierten Syntheseprotokollen von *Maue* und *Ellermann*.^[173,174] Der Gerüstbaustein **71** wurde mit kommerziell erhältlichem, orthogonal geschütztem *N*-Acetyl-*S*-trityl-cystein verestert. Als Kupplungsreagenz lieferte HCTU die besten Ergebnisse. Der in akzeptablen Ausbeuten erhaltene Baustein **140** wurde im nächsten Schritt mit TFA unter Zusatz von Triisopropylsilan zum freien Thiol **141** entschützt oder in einer von *Maue* entwickelten Eintopfreaktion entschützt und direkt unter sauren Bedingungen mit Aldithirol zu Disulfid **142** umgesetzt.^[174,176]

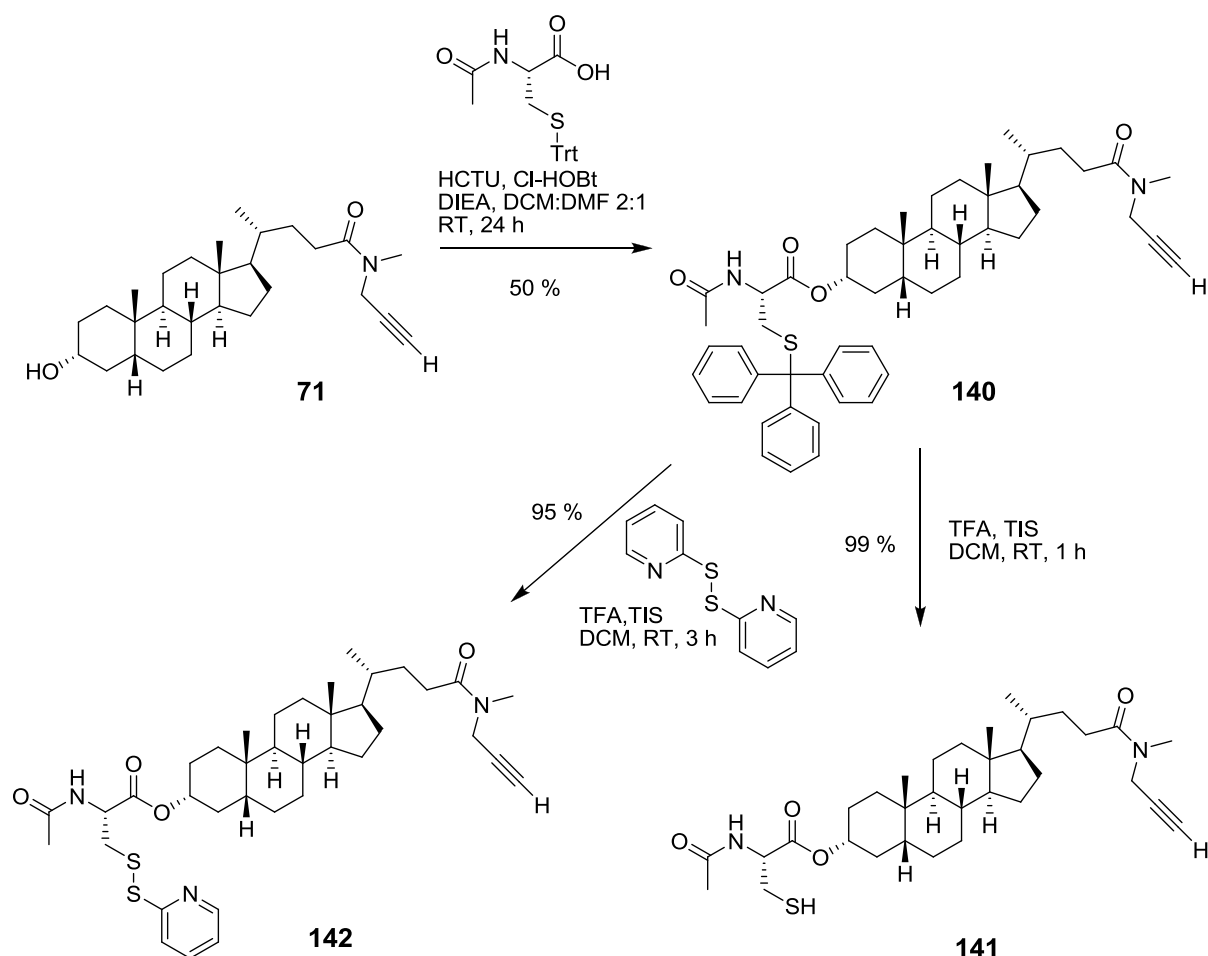


Abbildung 234: Synthese der Thiol- und Disulfid-Einheiten **141** und **142**.

Zum Aufbau des Transmembrangerüsts mit cysteinischer Thiolfunktion unter gleichzeitiger Installation der Bisphosphonat-Erkennungseinheit, wurden die Bausteine **75** und **140** mit Hilfe der bereits erfolgreich durchgeführten statistischen Glaser-Kupplung zum unsymmetrischen Dimer **143** umgesetzt. Durch die Verwendung eines doppelten Überschusses von **140** konnte auch bei dieser Synthese die Ausbeute des unsymmetrischen Dimers **143** auf 51 % gesteigert werden.

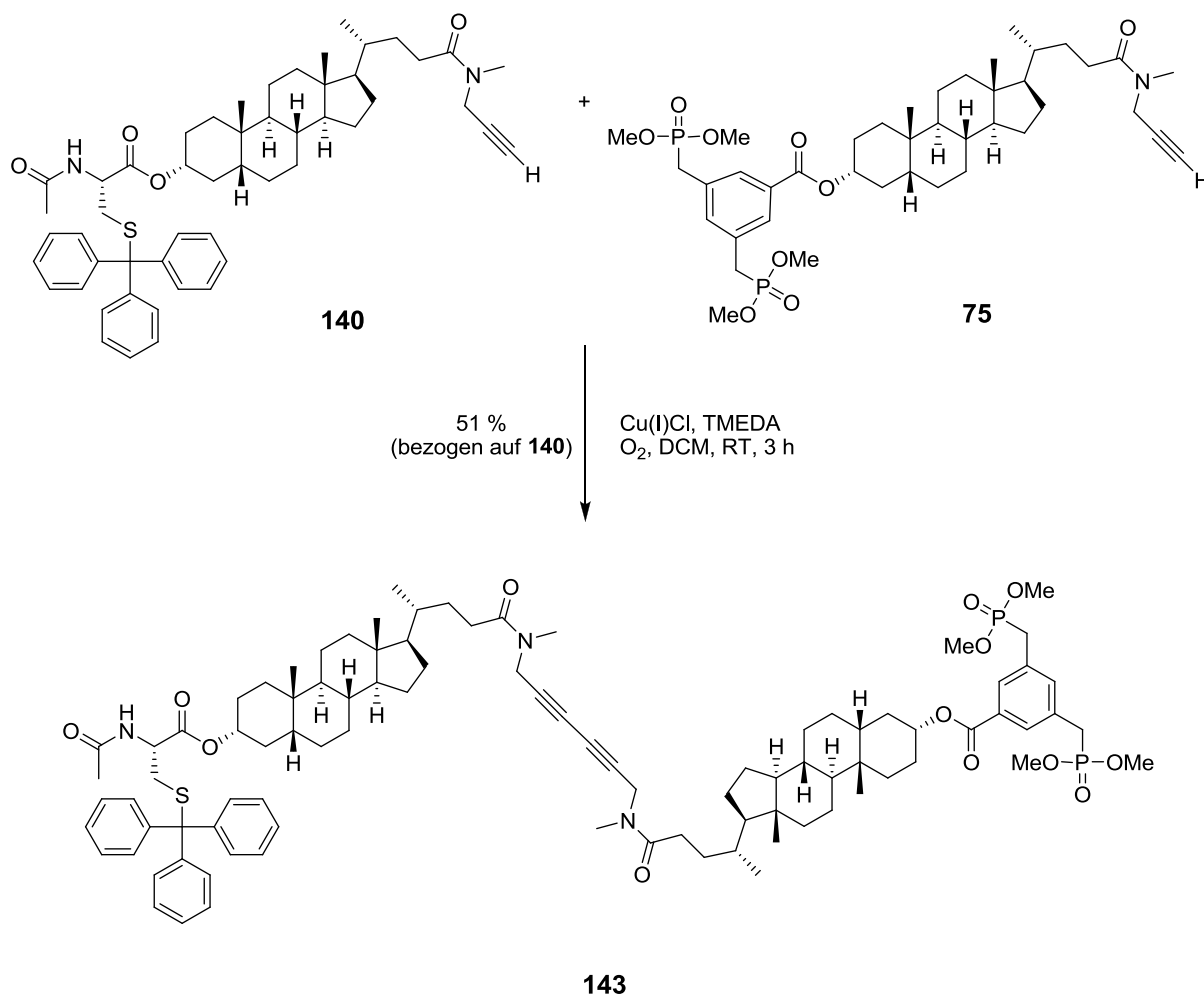


Abbildung 235: Cu(I) vermittelte Glaser-Kupplung der Bausteine 75 und 140.

An der so erhaltenen Verbindung **143** wurde die Trityl-Schutzgruppe unter sauren Bedingungen entfernt. Die abschließende Spaltung der Phosphonsäuremethylester mit LiBr lieferte den Rezeptor **138** mit freier Thiolfunktion über beide Stufen in quantitativer Ausbeute (Abbildung 236). Abbildung 237 zeigt das ^1H -NMR-Spektrum des Rezeptors **138**.

Zur Synthese des Rezeptors **139** mit funktionalisierter Disulfid-Funktion wurden an dem Transmembranbaustein **143** zuerst zwei der Phosphonsäuremethylester mit LiBr gespalten (Abbildung 239). Anschließend erfolgte die Umsetzung zum unsymmetrischen Disulfid erneut unter Verwendung der mehrfach durchgeführten Eintopfreaktion (Abbildung 239). Der gesplattene Rezeptor **144** konnte nicht mehr säulenchromatographisch gereinigt werden. Die Entfernung des abgespaltenen Triphenylmethans und Thiopyridins, sowie des Überschusses an Aldithriol konnte durch mehrmaliges Verreiben mit Diethylether und gründlichem Trocknen im Ölpumpenvakuum erreicht werden. Das ^1H -NMR-Spektrum des Rezeptors **139** ist in Abbildung 238 abgebildet.

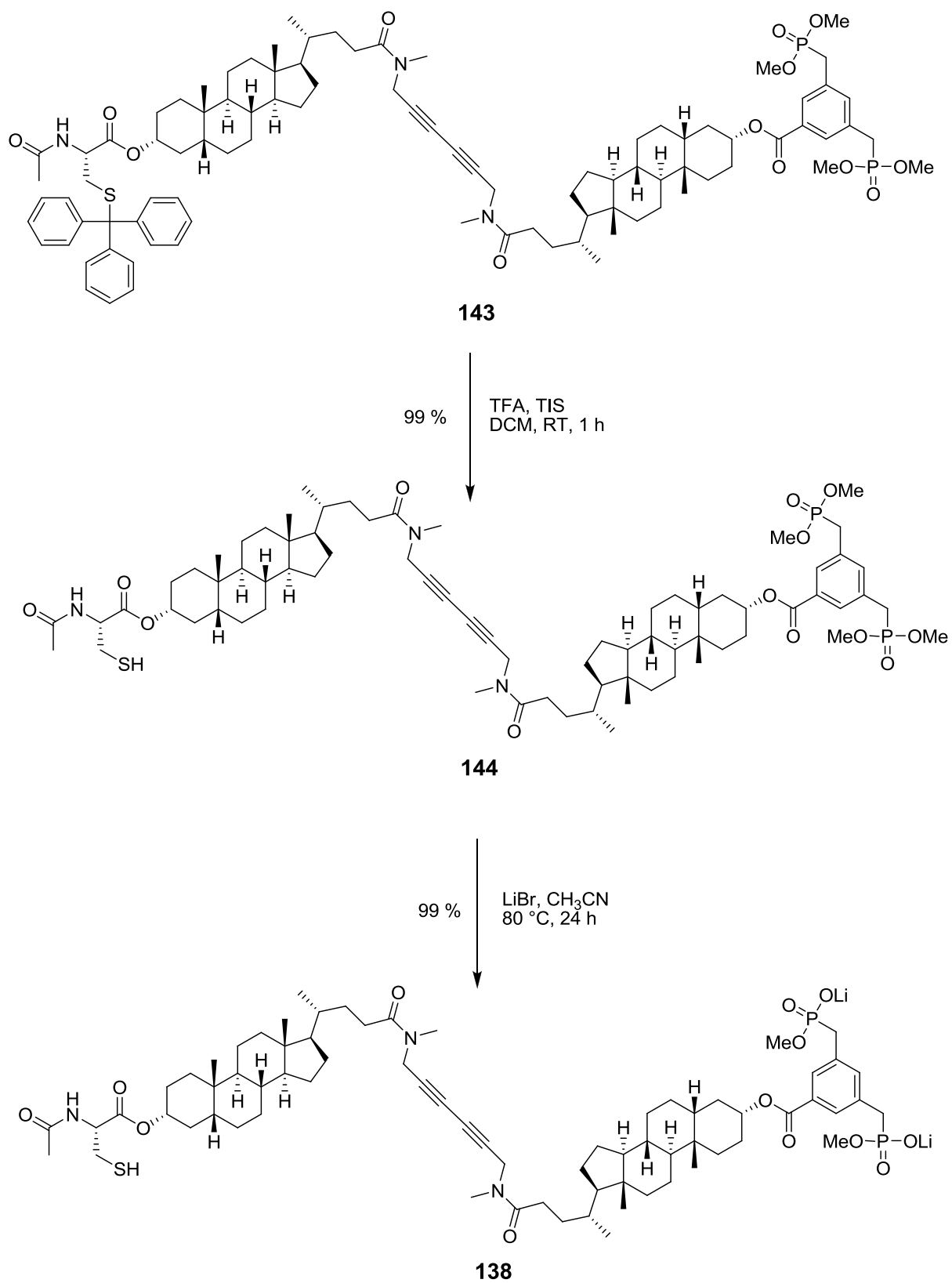


Abbildung 236: Synthese des Transmembranbausteins 138.

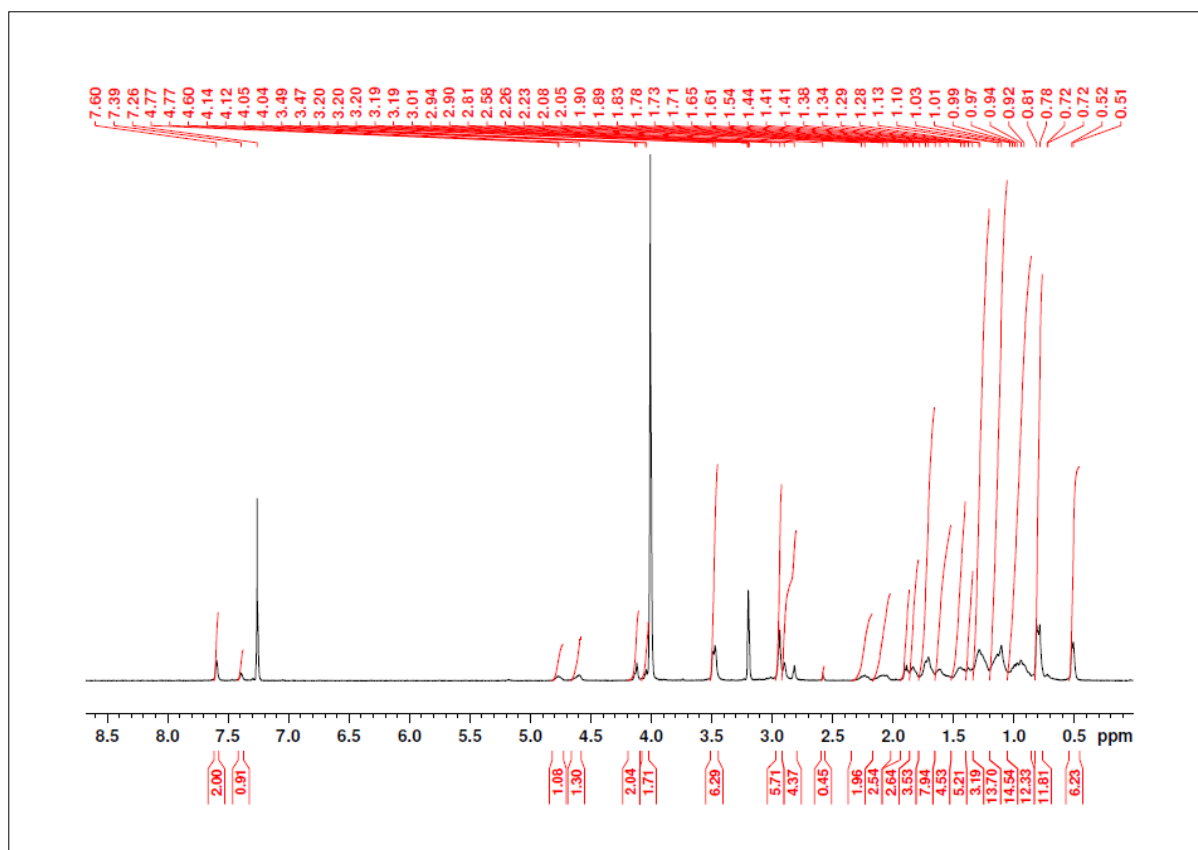


Abbildung 237: ^1H -NMR (500 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}-d_4 = 1:1$): *N*-Acetyl-cystein-(lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-BP(OLi) $_2$ 138.

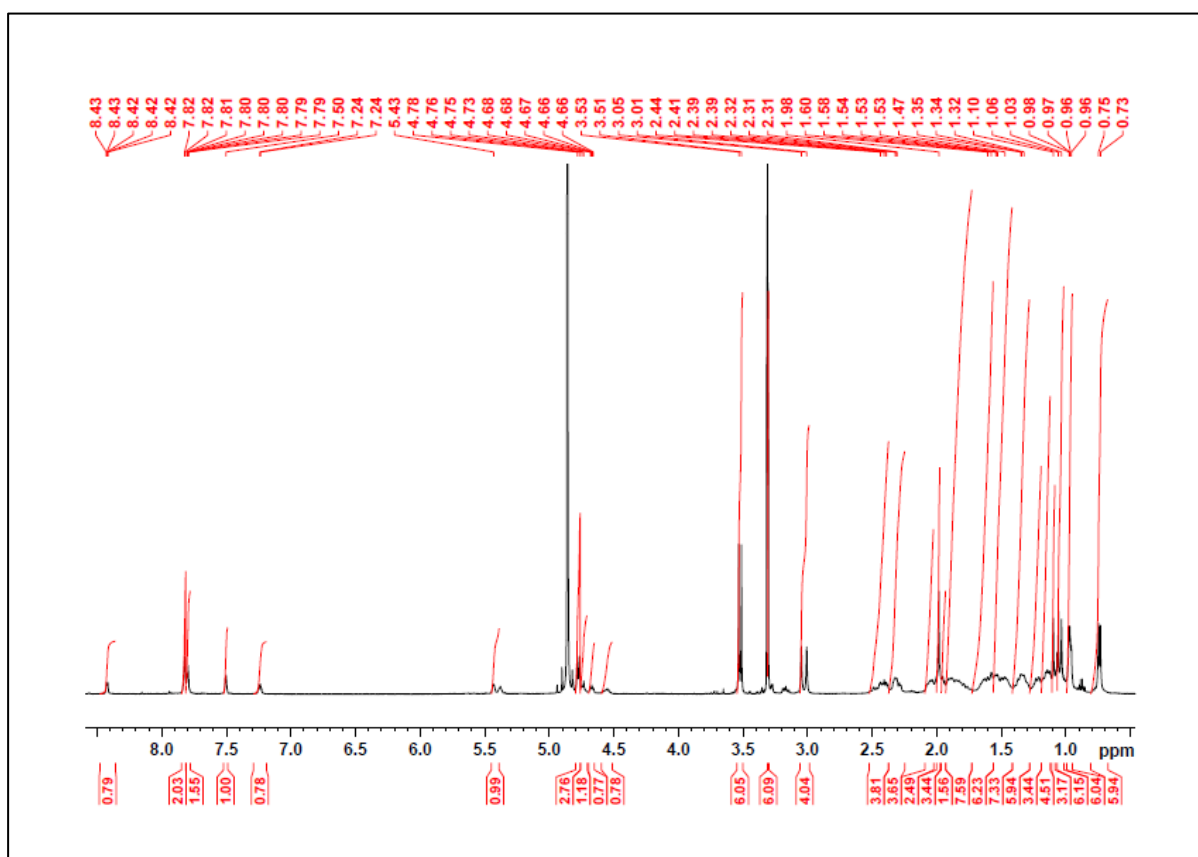


Abbildung 238: ^1H -NMR (500 MHz, $\text{MeOD}-d_4$): *N*-Acetyl-(*S-S*-Pyr)-cystein-(lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-BP(OLi) $_2$ 139.

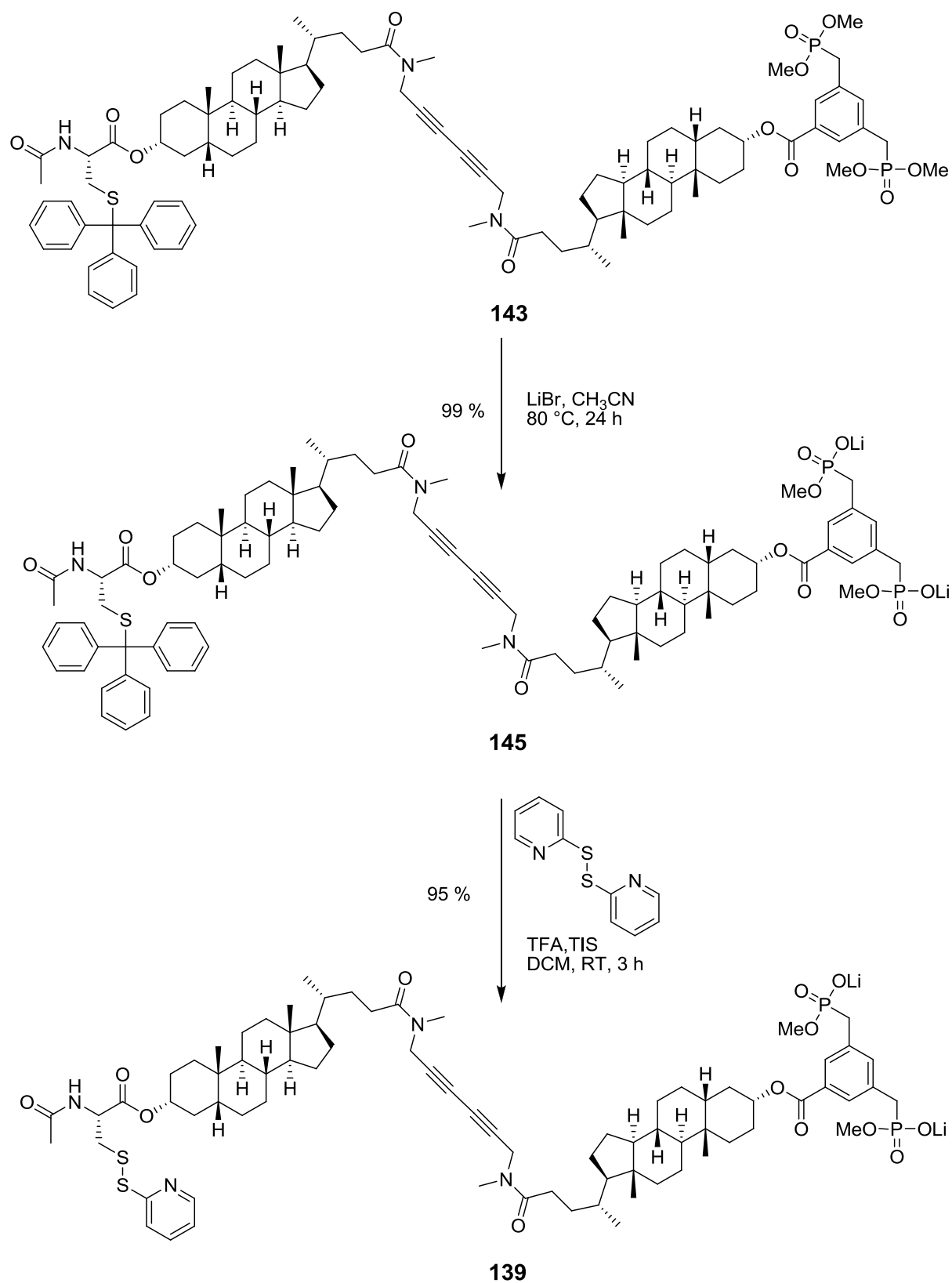


Abbildung 239: Synthese des Transmembranbausteins 139 mit Disulfidfunktion.

3.7.2 Signaltransduktionsexperimente mit den Rezeptoren 138 und 139

Das größte und sicherlich grundlegendste Problem ist die frühzeitige Reaktion der Thiol- und der Disulfidfunktion der Transmembranbausteine **138** und **139** während der Präparation der Liposomen. Weder die Veränderung der Lösungsmittelpolarität, noch die Modifikation der Liposomenpräparation (die Bausteine **59** und **60** sollten erst im fertigen Liposom vereinigt werden) konnten die vorzeitige Reaktion unterbinden.^[174] Daher sollte eine

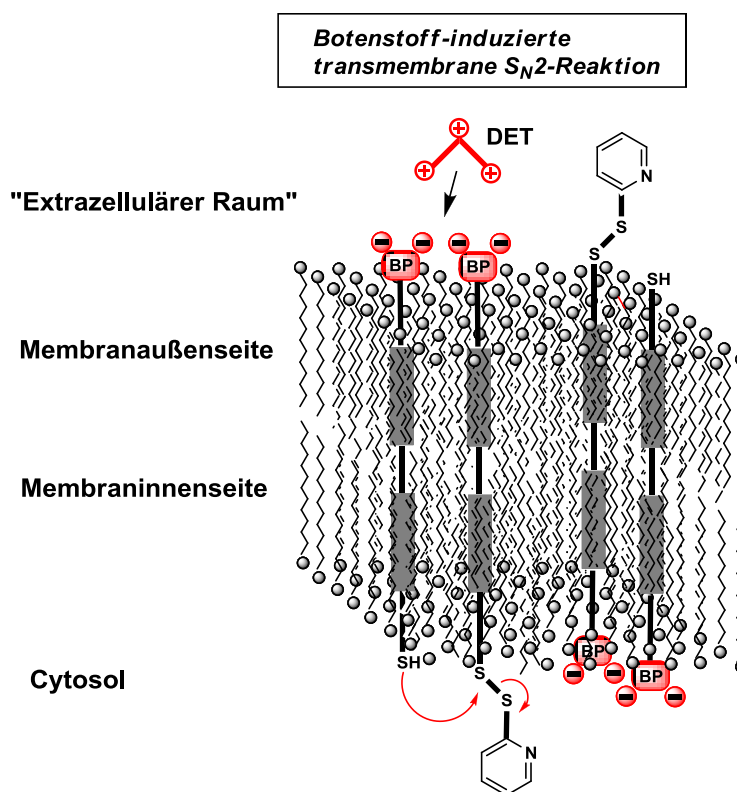


Abbildung 240: Schematische Darstellung der Signaltransduktion mit den Rezeptoren **138** und **139**.

Methode erarbeitet werden, die es nicht erforderlich macht, dass die beiden Bausteine **138** und **139** in einem organischen Lösungsmittel vereinigt werden müssen. In ersten Experimenten sollte versucht werden, die Ergebnisse von *Maue* mit den leicht modifizierten Rezeptoren **138** und **139** zu reproduzieren. Bei den Experimenten wurden allerdings zwei Modifikationen vorgenommen. Zum einen wurde das verwendete Liposomenmaterial durch das Gemisch aus DMPC/DPPC = 75 % : 25 % ersetzt. *Maue* und *Hunter* verwendeten als Matrixmaterial natürliches, aus Hühnereiweiss gewonnenes L- α -Phosphatidylcholin (Typ XVI-E).^[174] Es handelt sich hierbei um ein Gemisch aus Phosphatidylcholinen mit unterschiedlichen Fettsäureresten (~33 % Palmitinsäure, ~13 % Stearinsäure, ~31 % Ölsäure, 15 % Linolsäure und einem geringen Anteil anderer Fettsäurereste. Die Hauptkomponente bildet dabei das DPPC (Dipalmitoylphosphatidylcholin). Die mittlere Molmasse liegt bei ~768 g/mol. Die Phasenübergangstemperatur beträgt etwa 0 °C. Durch den Ersatz soll die laterale Beweg-

lichkeit der Rezeptoren **138** und **139** in der Membran herabgesetzt werden, um auch eine eventuell auftretende, vorzeitige Reaktion der Transmembranbausteine **138** und **139** in der Membran zu unterbinden. Zum anderen wurde das zur Detektion extrazellulärer Disulfid-Gruppen verwendete Triphenylphosphin-3,3,3-trisulfonsäure-trinatriumsalz (**146**) gegen DTNB (5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure) (**147**) ersetzt. Mit DTNB (**147**) können extrazelluläre Thiolfunktionen detektiert werden, so dass nach Zugabe des Botenstoffs DET geprüft werden kann, ob auf der Außenseite der Membran befindliche Thiolfunktionen ebenfalls, induziert durch DET, mit den Disulfidgruppen auf der Außenseite reagiert haben.

Die Präparation der Liposomen erfolgte nach der erfolgreich etablierten Vorschrift 3.3.3.2. Abbildung 241 zeigt den zeitabhängigen Absorptionsanstieg, verursacht durch Abspaltung von 2-Thiopyridin, direkt nach der Einlagerung der Rezeptoren **138** und **139** in die Liposomen und nach Zugabe des Botenstoffs DET (341 nm), sowie den Anstieg der Absorption nach Zugabe von DTNB (**147**) durch Reaktion mit den extrazellulären Thiolgruppen (412 nm). Bei diesem ersten Experiment konnten die Beobachtungen, die *Maue* bei seinen Versuchen zur botenstoff-induzierten Signaltransduktion gemacht hatte, bestätigt werden. Bereits direkt nach der Liposomenpräparation kann eine deutliche Absorption bei 341 nm detektiert werden. Dieser Anstieg ist wiederum auf die vorzeitige Reaktion der Transmembranbausteine **138** und **139** während der Liposomenpräparation zurückzuführen. Bezogen auf die maximale Absorption, die durch Freisetzung des sekundären Botenstoffs 2-Thiopyridin erreicht werden kann, sind auch im Falle der modifizierten Rezeptoren **138** und **139** etwa 50 % der vorhandenen Disulfide vorzeitig abreagiert. Durch die Zugabe von DET kann ein

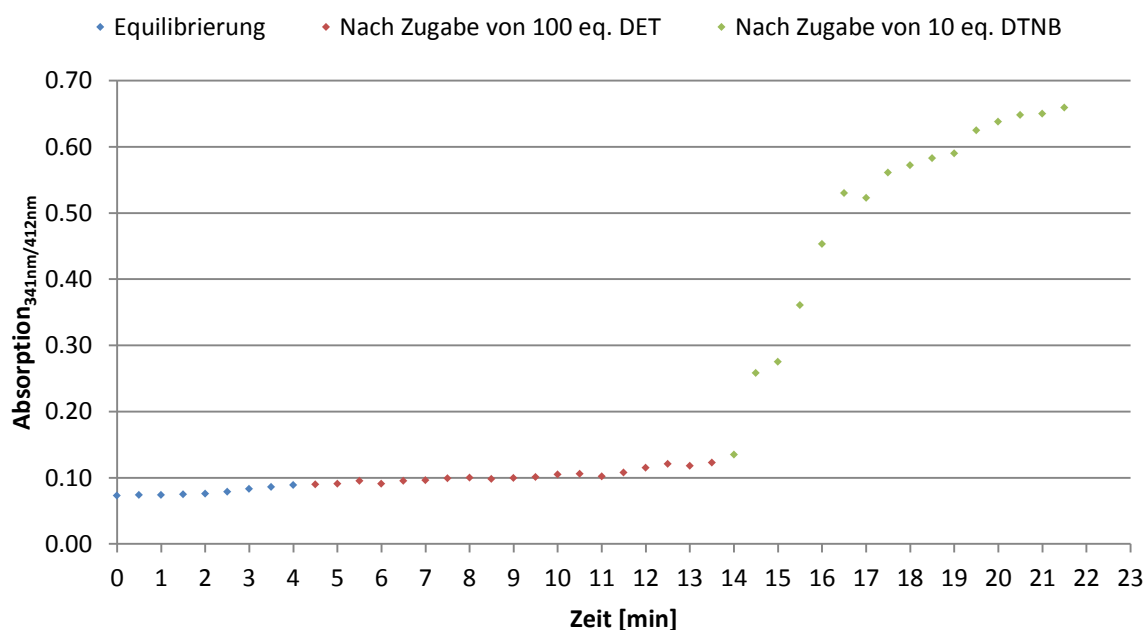


Abbildung 241: Einlagerung der Rezeptoren **138** und **139** nach Methode a) (Je 2.5 % in DMPC/DPPC = 75 %/25 %) – Zeitliche Abfolge der Reagenzienzugabe.

weiterer Anstieg der Absorption um etwa 10 % erzielt werden. Ob die weitere Freisetzung des Pyridin-Derivats tatsächlich durch den Signaltransduktionsprozess erfolgt oder durch Nebenreaktionen verursacht wird, wurde im Folgenden durch Referenzmessungen mit den einzelnen Rezeptoren **138** bzw. **139** in DMPC/DPPC-Liposomen überprüft (Abbildung 242 und Abbildung 243).

Im eigentlichen Experiment wurden nach Zugabe des DET, 10 eq. DTNB (**147**) zu den **138**- und **139**-dotierten Liposomen gegeben, um intakte Thiofunktionen auf der Aussenseite der Membran zu detektieren. Direkt nach der Zugabe ist ein starker Anstieg der Absorption bei 412 nm zu beobachten, der auf die Freisetzung von Thio(2-nitrobenzoesäure) (**148**) zurückzuführen ist und somit als Nachweis extrazellulärer Thiofunktionen herangezogen werden kann. Bei Betrachtung der Gesamtabsorption ist zu beachten, dass das zugesetzte DTNB (**147**) ebenfalls in der Lage ist, mit dem, während der Liposomenpräparation freigesetzten 2-Thiopyridin zu reagieren. Allerdings ist somit indirekt der Nachweis erbracht, dass der Absorptionsanstieg nach Zugabe des DET nur durch Freisetzung intravesikulärer 2-Thiopyridineinheiten erfolgt sein kann. In den Referenzexperimenten wurden die Bausteine **138** bzw. **139** jeweils unter Abwesenheit des Reaktionspartners in Liposomen eingelagert und in derselben Reihenfolge mit den Reagenzien versetzt. In beiden Experimenten ist zu beobachten, dass die Einlagerung der einzelnen Bausteine in das Liposomen keinen Anstieg der Absorption bei einer Wellenlänge von 341 nm zu Folge hat. Des Weiteren induziert die Zugabe des Botenstoffs DET ebenfalls keine Freisetzung von 2-Thiopyridin (Abbildung 242 und Abbildung 243). Einzig auf die Zugabe von 10 eq. DTNB (**147**) kann im Falle des Rezep-

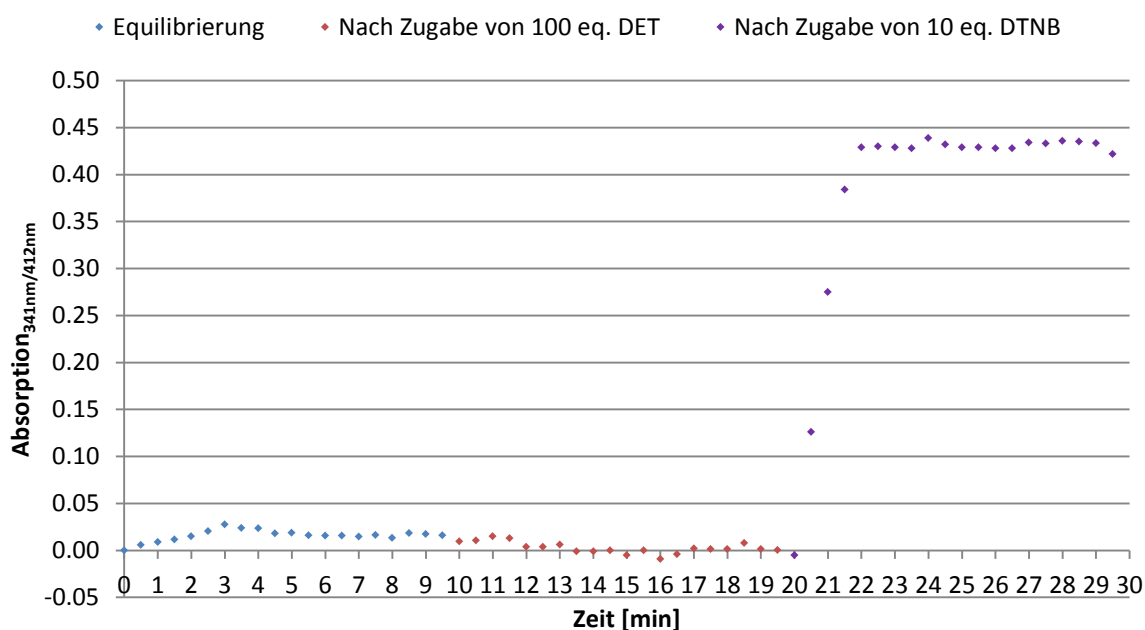


Abbildung 242: Einlagerung des Rezeptors **138** mit freier Thiofunktion (2.5 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %) – Zeitliche Abfolge der Reagenzienzugabe.

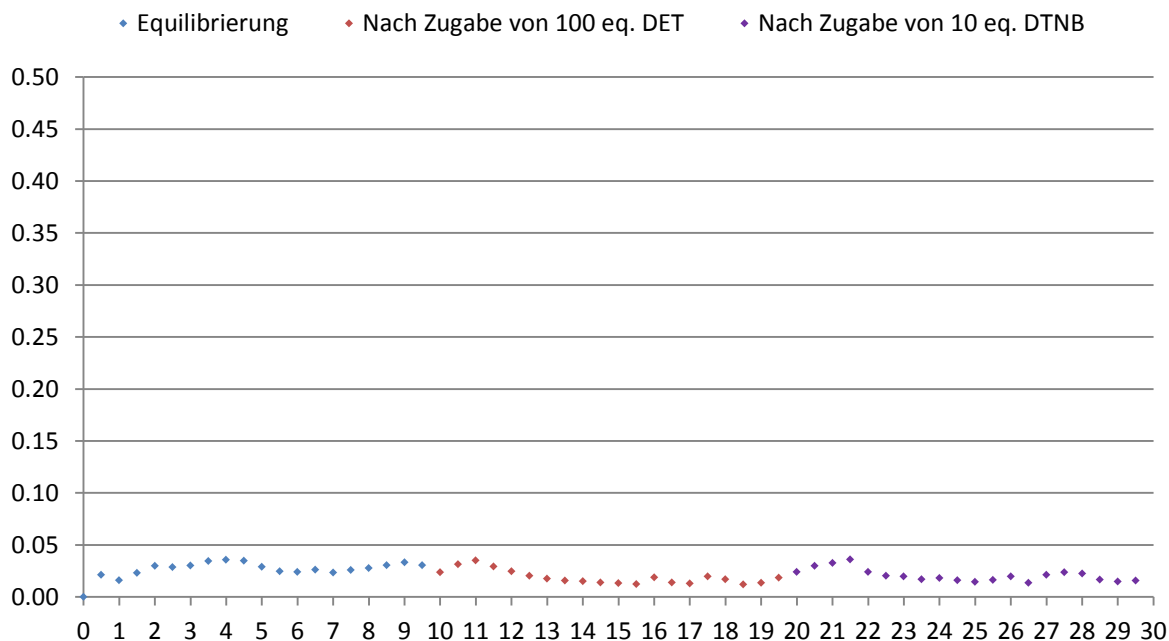


Abbildung 243: Einlagerung des Rezeptors 139 mit Disulfidfunktion (2.5 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %). – Zeitliche Abfolge der Reagenzienzugabe.

tors **138** der zu erwartende Absorptionanstieg bei 412 nm zu beobachten. Durch die Referenzexperimente kann somit ausgeschlossen werden, dass Nebenreaktionen eine botenstoffinduzierte Signaltransduktion vortäuschen. Um die vorzeitige Reaktionen der Rezeptoren **138** und **139** während der Liposomenpräparation zu unterbinden, sollte im Folgenden eine geeignete Präparationsmethode erarbeitet werden. Mit Hilfe modifizierter Präparationsprotokolle war es *Maue* nicht gelungen, die vorzeitige Reaktion zu unterdrücken.^[174] Ein Ansatz bestand in der Erhöhung der Polarität des organischen Lösungsmittels, um die S_N2 -Reaktion zwischen den Bausteinen bei der Vereinigung im organischen Lösungsmittel zu verringern. Auch eine Verringerung der Konzentration der Transmembranbausteine im Liposom konnte nicht zur Inhibierung der vorzeitigen Reaktion beitragen. Ein weiterer Versuch zielte auf die Vereinigung der Rezeptoren **59** und **60** im fertigen Liposom ab. Allerdings konnte hier beobachtet werden, dass die Zugabe des Rezeptors **60** in fester Form zu einem **59**-dotierten Liposomen und anschließender Behandlung im Ultraschallbad nicht zu der gewünschten Einlagerung von **60** führte.

Auf Grundlage der Vorarbeiten in diesem Bereich sollte versucht werden, den zuletzt genannten Ansatz weiter zu verfolgen und zu modifizieren. Da keine bekannte Möglichkeit besteht, die vorzeitige Reaktion der Bausteine **138** und **139** in einem organischen Lösungsmittel zu unterbinden, sollte ein geeignetes Verfahren erarbeitet werden, die Rezeptoren **138** und **139** in Gegenwart des Lipidmaterials im gepufferten, wässrigen Medium zu vereinigen. Zu diesem Zweck wurde das Protokoll zur Präparation dotierter, unilamellarer Liposomen

somen wie folgt modifiziert und unter Verwendung der bereits erfolgreich eingesetzten Rezeptoren **67** und **121** auf die allgemeine Anwendbarkeit überprüft.

Die Verwendung der Rezeptoren **67** und **121** hat den Vorteil, dass zum einen der direkte Vergleich der Signalübertragung, mit den bereits vorliegenden Ergebnissen erbracht werden kann und das zum anderen, ein während der Präparation der Liposomen, chemisch inertes Rezeptorpaar keine vorzeitige Reaktion der *second messenger*-Funktion zulässt. Für die Modell-Experimente wurden Liposomen mit einer Dotierung von je 3.0 % der Transmembranbausteine **67** und **121** in einer Lipidmatrix aus DMPC/DPPC = 75 % - 25 % verwendet. Als erstes sollte ausschließlich der Rezeptor **67** mit dem Lipidmaterial im organischen Lösungsmittel vereint werden. Der Rezeptor **121** mit Dabcyl-Quencher-Einheit sollte im letzten Schritt der Präparation mit dem Lipid/Rezeptor-Gemisch im wässrigen Medium vereinigt werden. Dementsprechend wurden 500 μL der Transmembranbausteinlösung ($c = 10^{-4} \text{ mol/L}$) **67** mit 750 μL der DMPC-Stammlösung ($c = 2 \text{ mmol/L}$) und 250 μL DPPC-Stammlösung ($c = 2 \text{ mmol/L}$) versetzt. Das Gemisch wurde am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt und anschließend für min. 3 h gefriergetrocknet. Der resultierende Film wurde in 950 μL MES-Puffer ($c = 375 \text{ mmol/L}$, $\text{pH} = 5.5$, 0.5 mmol/L L-(-)-Ascorbinsäure) aufgenommen und für min. 30 sec gevortext. Der Zusatz von L-(-)-Ascorbinsäure soll eine eventuelle Oxidation der freien Thiolfunktion des Transmembranbausteins **138** in den eigentlichen Experimenten verhindern. Anschließend wurden 50 μL der 10^{-3} molaren Stammlösung des Transmembranbausteins **121** in MeOH zu der wässrigen Liposomenlösung gegeben. Die Liposomenlösung wurde zur Herstellung unilamellarer Liposomen auf 30°C erwärmt und

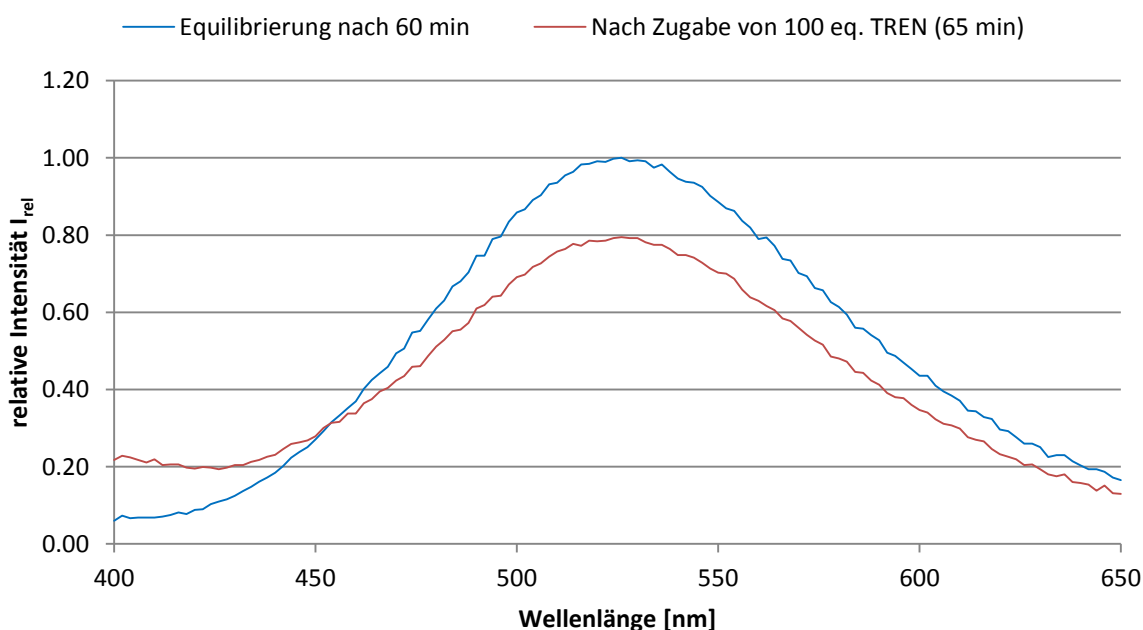


Abbildung 244: Änderung der relativen Intensitäten I_{rel} nach Zugabe von 100 eq. TREN (114) (Je 3 % **67** und **121** in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %).

für weitere 2 min gevortext. Danach wurde die so erhaltene Liposomenlösung 19-mal (ungerade Anzahl an Extrusionszyklen) durch eine 200 nm Polycarbonatmembran extrudiert. Die Signaltransduktionsexperimente wurden analog zu den in Kapitel 3.5 vorgestellten Experimenten durchgeführt. Mit Hilfe dieser ersten Testmessung konnte gezeigt werden, dass der Rezeptor **121** vollständig in die Liposomen eingelagert wurde. Die Zugabe von 100 eq. TREN konnte, wie auch in den vorangegangenen Experimenten, in denen die Präparation der Liposomen nach der Standard-Methode erfolgte, eine Signalübertragung von etwa 20 % induzieren (Abbildung 244).

Auf Grundlage dieser sehr positiven Ergebnisse erhofften wir uns für die Experimente mit den Rezeptoren **138** und **139** eine deutlich reduzierte, vorzeitige Reaktion während der Liposomenpräparation und somit eine deutlich gesteigerte, botenstoff-induzierte Signaltransduktion. Im Gegensatz zu den ersten Experimenten mit den Transmembranbausteinen **138** und **139** sollten im nachgeschalteten Kontrollexperiment nicht die extrazellulären Thiolfunktionen mittels DTNB (**147**) nachgewiesen werden, sondern der Nachweis erbracht werden, dass nach Zugabe des Botenstoffs auf der Außenseite der Membran befindliche Disulfid-Gruppen noch intakt sind. Zur Reduktion der disulfidisch gebundenen 2-Thiopyridin-Einheiten wurde Triphenylphosphin-3,3,3-trisulfonsäure-trinatriumsalz (**146**) verwendet. Betrachtet man den Anstieg der Absorption direkt nach der Präparation der Liposomen, so ist zu erkennen, dass durch die modifizierte Präparationsmethode die vorzeitige Reaktion der Bausteine **138** und **139** deutlich verringert werden konnte. Bezogen auf die maximal zu beobachtende Absorption wurden anstelle von 50 % nur 20 % der 2-Thiopyridin-Einheiten vorzeitig freigesetzt (Abbildung 245). Durch Zugabe von 50 eq. DET konnte eine weitere Freisetzung des sekundären Botenstoffs induziert werden. Die, durch die Absorption bei 341 nm detektierbare Signalstärke beträgt nach der Liposomenpräparation und der Zugabe des primären Botenstoffs insgesamt etwa 50 %. Geht man von einer statistischen Abspaltung des 2-Thiopyridin auf beiden Seiten der Doppelmembran während der Liposomenpräparation und einer Freisetzung, induziert durch Zugabe des Botenstoffs, ausschließlich im Inneren des Liposoms aus, so ist auf die Zugabe des Reduktionsmittels **146** ein weiterer Signalanstieg von etwa 40 % zu erwarten. Diese Annahme kann durch das Experiment bestätigt werden. Der Anstieg durch Zugabe des Reduktionsmittels **146** liegt zwischen 40 % - 50 %. In Kontrollexperimenten wurde der Absorptionsanstieg nach der Präparation der Liposomen und der Reagenzienzugabe über einen längeren Zeitraum verfolgt, um Nebenreaktionen ausschließen zu können. Selbstverständlich wurde das Experiment ebenfalls mit umgekehrter Reihenfolge der Reagenzienzugabe durchgeführt, um eventuell auftretende experimentelle Fehler aufzudecken. In Abbildung 246 sind die Ergebnisse mit umgekehrter Zu-

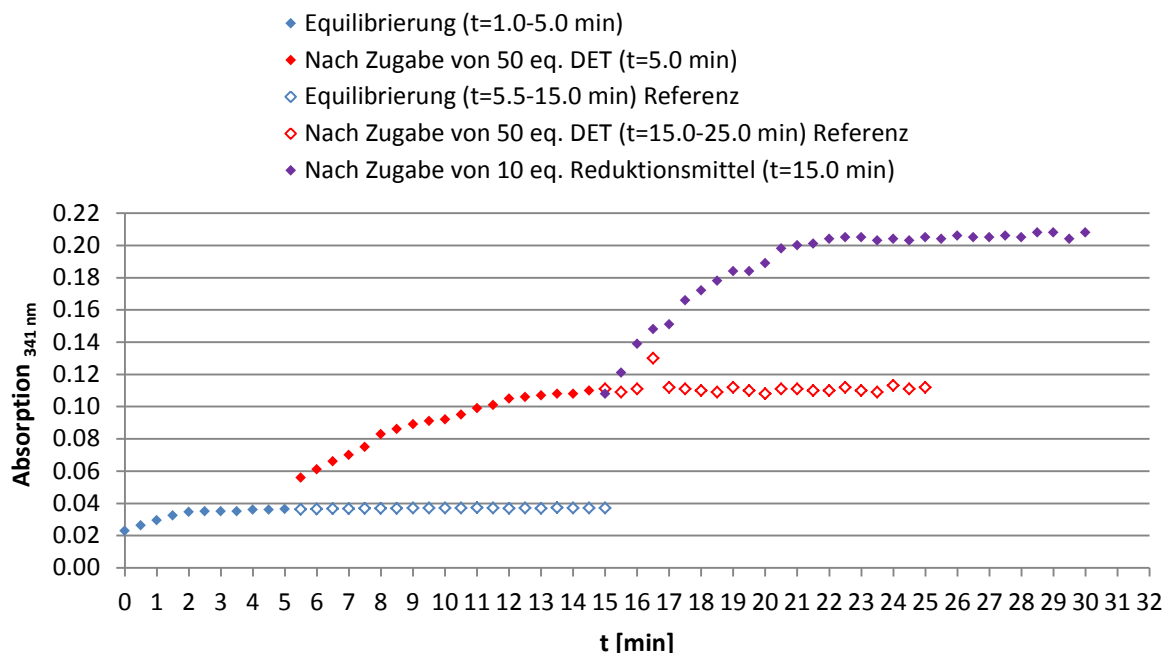


Abbildung 245: Einlagerung der Rezeptoren 138 und 139 nach Methode b) (Je 2.5 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %) - Zeitliche Abfolge der Reagenzienzugabe (1. Zugabe von 50 eq. DET; 2. Zugabe von 10 eq. Reduktionsmittel 146).

gabe der Reagenzien dargestellt. Die in dieser Messreihe gemachten Beobachtungen stehen im Einklang zum ersten Signaltransduktionsexperiment. Die vorzeitige Abspaltung des sekundären Botenstoffs beträgt auch hier in etwa 20 %. Auf Zugabe des Reduktionsmittels **146** werden ebenfalls weitere 50 % der 2-Thiopyridin-Einheiten abgespalten, so dass in diesem Fall durch die Zugabe des Botenstoffs DET eine transmembrane Signalleitung von 30 % zu erwarten ist, die im Folgenden auch tatsächlich detektiert werden konnte (Abbildung 246).

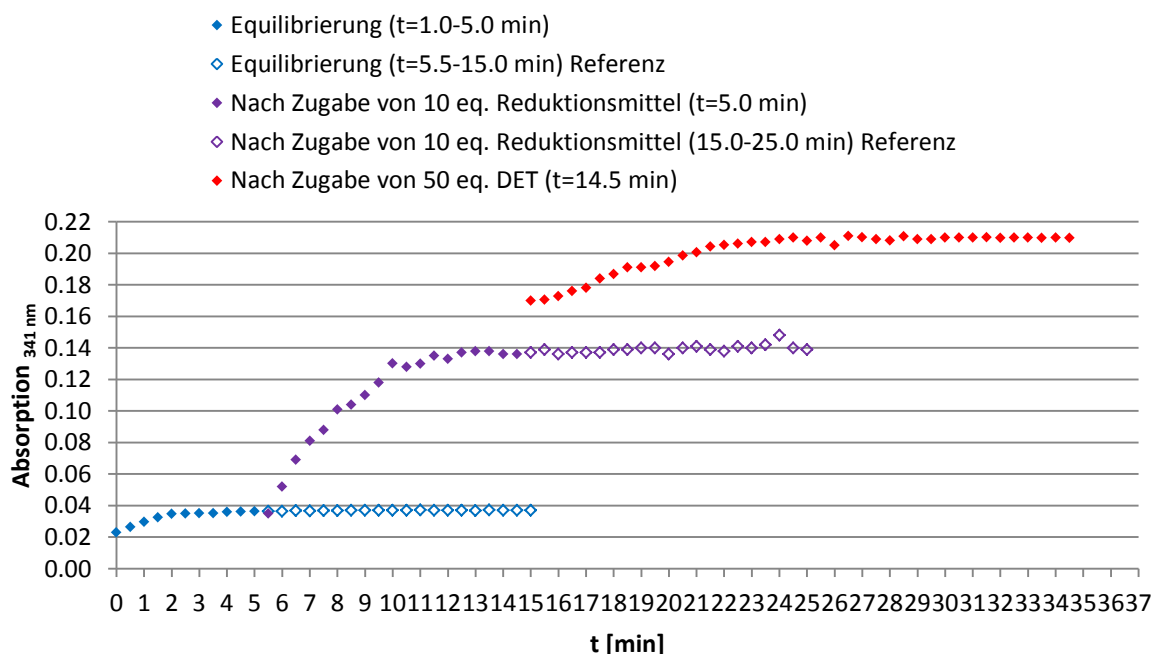


Abbildung 246: Einlagerung der Rezeptoren 138 und 139 nach Methode b) (Je 2.5 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %) - Zeitliche Abfolge der Reagenzienzugabe (1. Zugabe von 10 eq. Reduktionsmittel 146; 2. Zugabe von 50 eq. DET).

Auftretende Trübungserscheinungen, verursacht durch Zugabe der Reagenzien, können in beiden Fällen, durch Beobachtung der Absorption über einen großen Wellenlängenbereich ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse aus den Experimenten deuten stark auf eine erfolgreiche transmembrane Signalleitung mit den Rezeptoren **138** und **139**. Um die positiven Ergebnisse zu bestätigen und abzusichern, sollen die Rahmenbedingungen und mögliche auftretende Effekte, die eine gerichtete Signalleitung über die Doppelmembran vortäuschen könnten, näher betrachtet werden. Eine der entscheidenden Fragestellungen, die die Einlagerungsgeometrie dimerer Lithocholsäure-Rezeptoren betrifft, konnte bereits durch die Experimente mit den Rezeptoren **66** und **67** beantwortet werden. Durch den Zusatz der externen Fluoreszenzsonde Eosin Y **112** konnte die gestreckte Einlagerung der Rezeptoren **66** und **67** in der Doppelmembran nachgewiesen werden. Durch den Zusatz des Reduktionsmittels **146** kann dieser Nachweis auf einem unabhängigen Weg bestätigt werden. Bei einer „U-förmigen“ Einlagerung der Rezeptoren **138** und **139** sollte im Falle des ersten Experi-

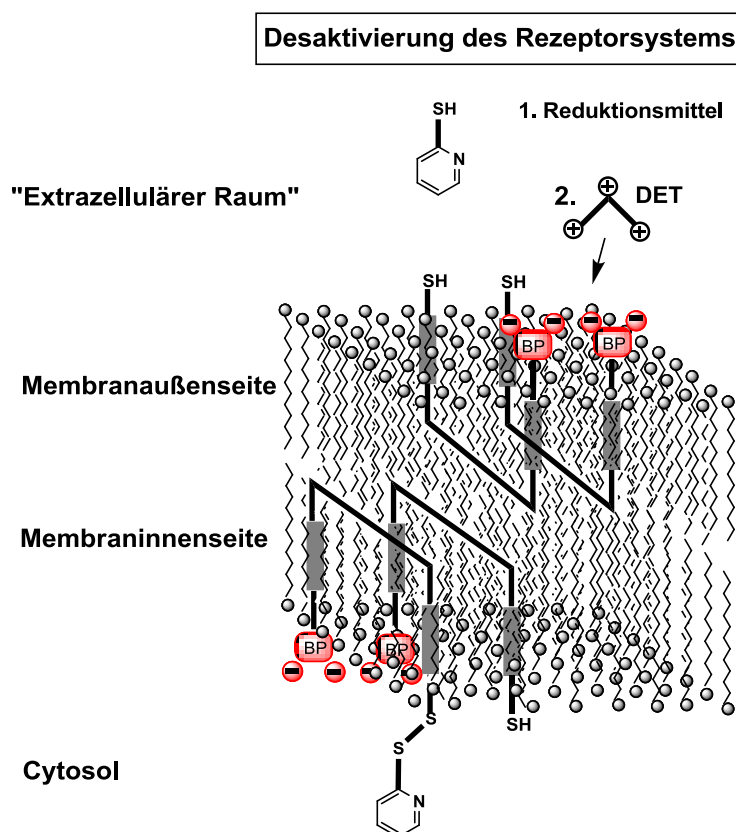


Abbildung 247: Bei "U-förmiger" Einlagerung des Rezeptorsystems **138/139** erfolgt durch Zugabe des Reduktionsmittels **146** eine Desaktivierung des Signaltransduktionssystems.

ments, nach Zugabe des Botenstoffs DET, auf die Zugabe des Reduktionsmittels **146** kein weiterer Anstieg der Absorption zu beobachten sein, da bei dieser Einlagerungsgeometrie nahezu alle, auf der Außenseite der Membran vorhandenen und zur Signaltransduktion befähigten Disulfid-Funktionen abgespalten sein sollten (Abbildung 247). Für die umgekehrte

Zugabe der Reagenzien wäre derselbe Effekt zu erwarten. Nach Reduktion aller extrazellulären 2-Thiopyridin-Einheiten sollte die Zugabe des Botenstoffs DET zu keiner weiteren Verstärkung des Signals führen (Abbildung 247).

Der auf Zugabe beider Reagenzien im realen Experiment beobachtete Anstieg der Absorption ist nur mit einer gestreckten Konformation der Rezeptoren **138** und **139** in der Lipiddoppelmembran zu erklären (Abbildung 245 und 246). Der Ausschluss der Permeabilität der Doppelmembran für den zugesetzten Botenstoff DET konnte in einem, von den eingelagerten Rezeptoren unabhängigen Referenzexperiment bestätigt werden, wodurch der Nachweis der Unidirektionalität der Signaltransduktion erbracht ist (vgl. 3.4.7).

3.7.3 Ausschluss einer interzellulären Reaktion der Rezeptoren **138** und **139**

Durch die statistische Einlagerung der Rezeptoren **138** und **139** sind auch bei diesem Rezeptorsystem die Thiol- und 2-Thiopyridin-Einheiten, sowohl auf der Innen-, als auch auf der Außenseite der Membran lokalisiert. Um auszuschließen, dass die Komplexierung des Botenstoffs DET durch zwei Bisphosphonat-Pinzetten, die auf zwei unterschiedlichen Liposomen lokalisiert sind erfolgt und damit einhergehend eine Verringerung des räumlichen Abstands zwischen ebenfalls auf der Außenseite der Membran verankerten *second messenger*-Funktionen bedingt ist, wurden im folgenden Experiment die Rezeptoren **138** und **139** getrennt voneinander in Liposomen eingelagert und die Liposomenmischung der separierten Rezeptoren **138** und **139** mit dem Botenstoff DET versetzt (Abbildung 248).

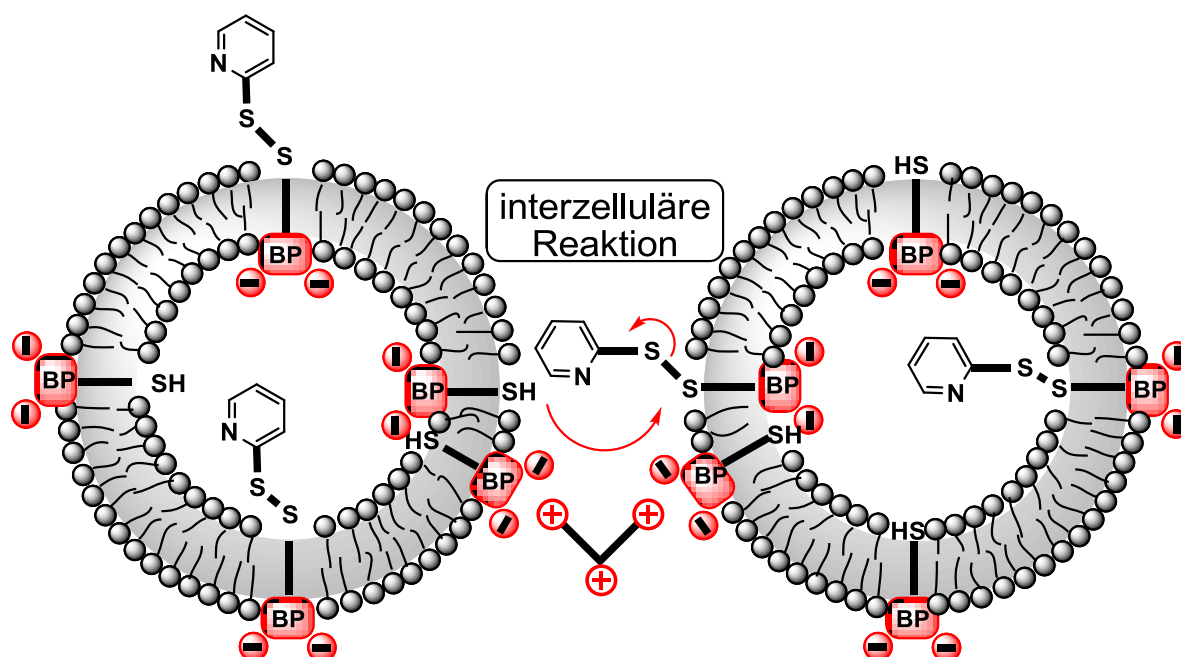


Abbildung 248: Mögliche interzelluläre Reaktion der Rezeptoren **138** und **139**.

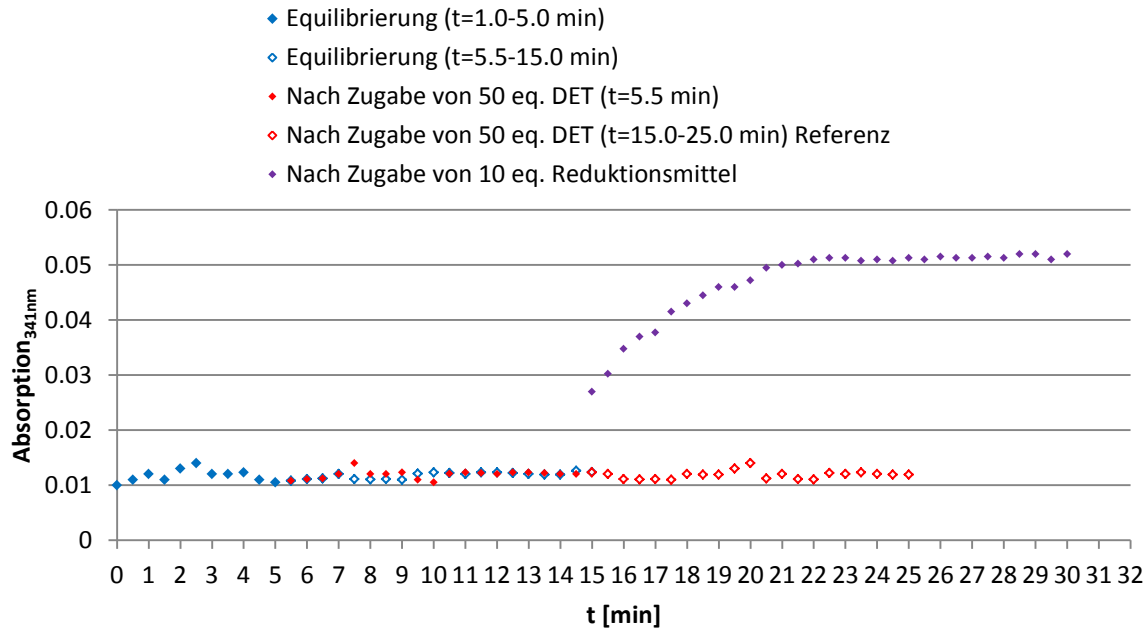


Abbildung 249: Ausschluss einer interzellulären Reaktion der Rezeptoren 138 und 139 in DMPC/DPPC = 75 % -25 %.

Die Zugabe des Triamins DET führte zu keinem Anstieg der Absorption bei einer Wellenlänge von 341 nm (Abbildung 249). Um die Intaktheit der Liposomen zu überprüfen, wurde auch in diesem Experiment das Reduktionsmittel **146** zugegeben. Die Zugabe führt erwartungsgemäß zum Anstieg der Absorption, da die Disulfidgruppen auf der Außenseite des **139**-dotierten Liposoms für das Reduktionsmittel **146** zugänglich sind. Mit Hilfe dieses einfachen Experiments konnte somit auch für dieses Rezeptorpaar der Nachweis erbracht werden, dass eine mögliche interzelluläre Reaktion keinen Beitrag zur beobachteten Signaltransduktion liefert. Im Vergleich zu den Rezeptoren **66** und **67** ist das System aus den Transmembranbausteinen **138** und **139** deutlich empfindlicher gegenüber einem interzellulären Kontakt. Bereits ein kurzzeitiger geringer räumlicher Abstand zwischen zwei Liposomen kann, z.B. während der Liposomenpräparation, zur Abspaltung der Pyridin-Einheit führen.

Für die fluoreszenzgelabelten Rezeptoren **66** und **67** hingegen ist ein permanenter Kontakt zwischen zwei Liposomen durch Chelatisierung des Botenstoffs notwendig, um einen, auf der Zeitskala messbaren Energietransfer zwischen dem FRET-Paar zu liefern.

3.7.4 Verwendung anderer Lipidmischungen

In den Signaltransduktionsexperimenten mit den fluoreszenzgelabelten Rezeptoren **66** und **67** konnte nachgewiesen werden, dass die Zusammensetzung des Lipidmaterials einen nicht unbeträchtlichen Einfluss auf den Prozess der Signaltransduktion ausübt. Die, mit Reaktivgruppen versehenen Rezeptoren **138** und **139** wurden bisher nur in Liposomen

mit einem Lipidmischungsverhältnisses von DMPC/DPPC = 75 % - 25 % eingelagert, da diese Mischung für die erste Generation an Transmembranrezeptoren die besten Ergebnisse lieferte. Im Folgenden sollte überprüft werden, ob die Zusammensetzung der Liposomen ebenfalls einen messbaren Einfluss auf die Abspaltung des chemischen Botenstoffs 2-Thiopyridin hat. Zu diesem Zweck wurden die Rezeptoren **138** und **139** in Liposomen, bestehend aus den reinen Lipiden DPPC bzw. DMPC eingelagert und die Präparation der Liposomen und die Signaltransduktionsexperimente unter identischen Bedingungen durchgeführt.

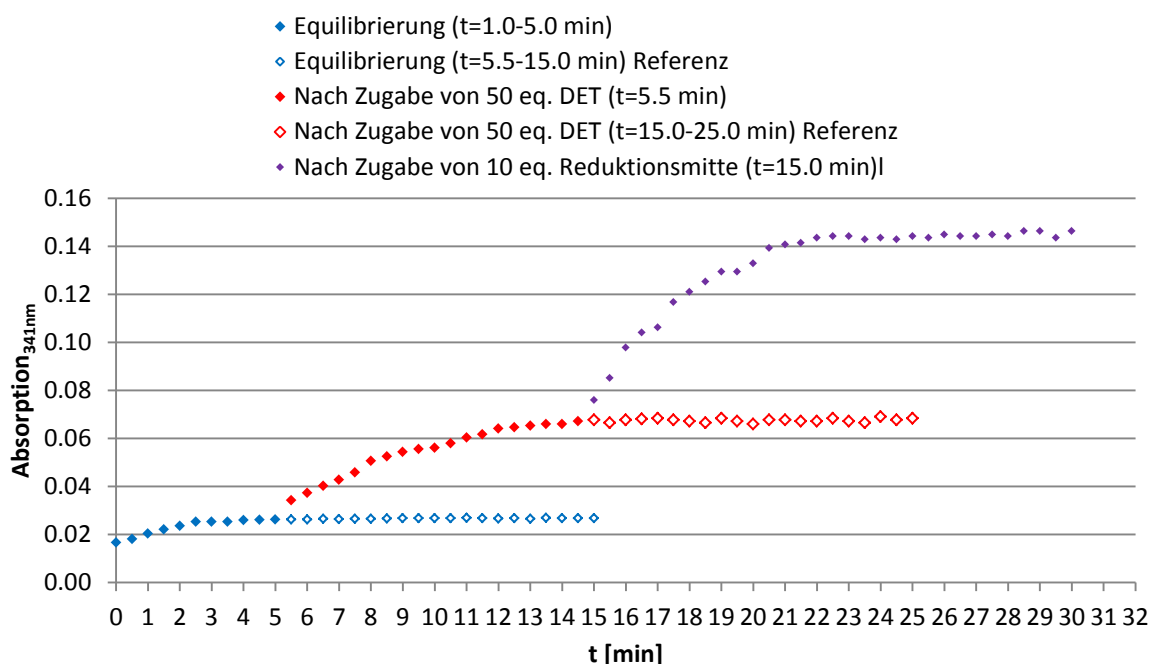


Abbildung 250: Einlagerung der Rezeptoren **138** und **139** (Je 2.5 % in DPPC) – Zeitliche Abfolge der Reagenzienzugabe (1. Zugabe von 50 eq. DET; 2. Zugabe von 10 eq. Reduktionsmittel **146**).

Abbildung 250 zeigt die Ergebnisse, die unter Verwendung von DPPC als Lipidmaterial erhalten werden konnten. Auf den ersten Blick scheint die Einlagerung in DPPC-Liposomen einen positiven Einfluss auf die vorzeitige Reaktion der Transmembranbausteine **138** und **139** zu haben, da nach der Equilibrierung geringere Absorptionswerte gemessen werden konnten. Betrachtet man aber die maximal erzielte Gesamtabsorption nach Zugabe aller Reagenzien, so ist zu erkennen, dass diese, im Vergleich zu den Experimenten in DMPC/DPPC-Liposomen geringer ausfällt. Da in beiden Experimenten mit der gleichen Dotierung der Rezeptoren **138** und **139** gearbeitet wurde, lässt diese Beobachtung den Schluss zu, dass der Baustein **139** bei der Präparation der Liposomen nicht vollständig eingelagert wurde. Allerdings spricht gegen diese Vermutung, dass die Zugabe des Reduktionsmittels **146** einen Anstieg der Absorption um etwa 50 % zur Folge hat. Betrachtet man den Anstieg, der durch Zugabe des Botenstoffs DET induziert wurde, fällt auf, dass dieser im

Vergleich zu den Experimenten in den Lipidmischungen geringer ausfällt. Dies lässt eigentlich nur den Schluss zu, dass nicht die Einlagerung des Rezeptors **139**, sondern des Rezeptors **138** in das Liposom unvollständig ist. Eine einfache Erklärung für diesen Umstand kann nicht erbracht werden, da der Rezeptor **138** zusammen mit dem Lipidmaterial nach der Standard-Präparationsmethode vereinigt wurde. Eine unvollständige Einlagerung des Rezeptors **139** hingegen hätte mit der deutlich erhöhten Phasenübergangstemperatur T_C und der damit verbundenen geringeren Beweglichkeit der Doppelmembran und der späteren Zugabe des Bausteins **139** begründet werden können.

Die Verwendung von reinem DMPC als Lipidmaterial lieferte im Vergleich zu den Experimenten im Lipidgemisch bzw. DPPC deutlich andere Ergebnisse. Direkt nach der Liposomenpräparation ist bereits ein Großteil des sekundären Botenstoffs abgespalten (Abbildung 251). Die Zugabe des Botenstoffs DET, bzw. Reduktionsmittels **146** haben dementspre-

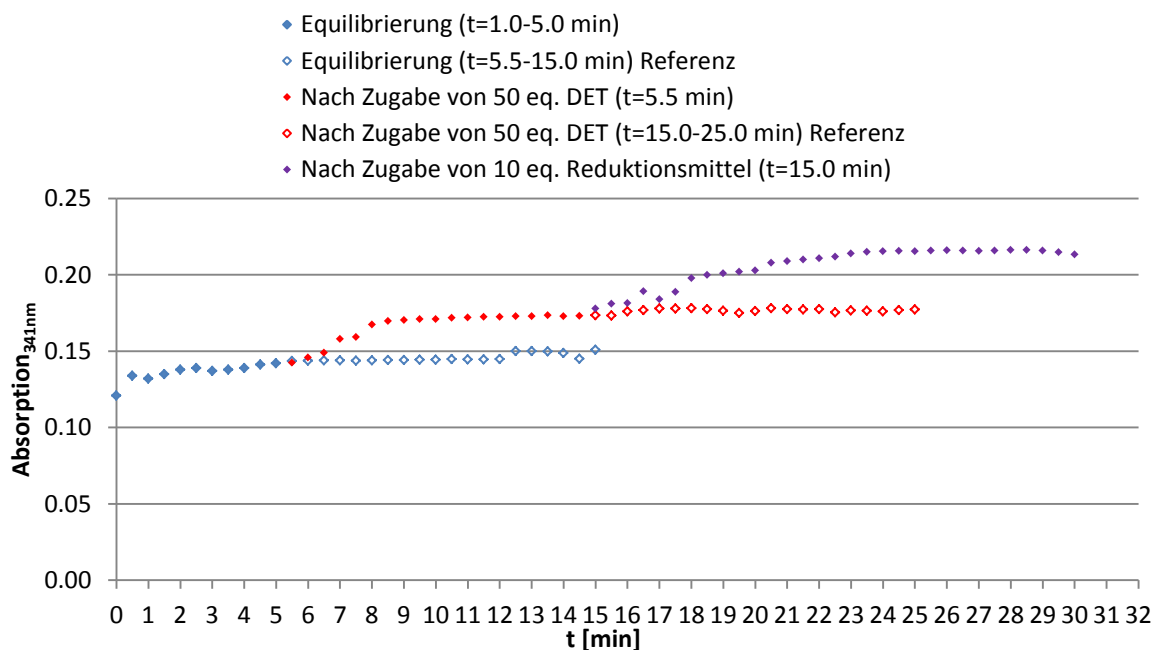


Abbildung 251: Einlagerung der Rezeptoren **138** und **139** (Je 2.5 % in DMPC) – Zeitliche Abfolge der Reagenzienzugabe (1. Zugabe von 50 eq. DET; 2. Zugabe von 10 eq. Reduktionsmittel **146**).

chend nur einen sehr geringen Anstieg der Absorption zur Folge. Die Betrachtung der Gesamtabsorption zeigt zwar, dass die Einlagerung der Rezeptoren **138** und **139**, im Vergleich zu DPPC vollständig ist, doch kann durch Zugabe von DET nur noch eine Signalleitung von etwa 10 % erzielt werden. Diese zusätzlichen Experimente zeigen, dass das Lipidmaterial ebenfalls einen starken Einfluss auf die Signaltransduktion bei der Verwendung der 2. Generation von Transmembranbausteinen hat. Die vorzeitige Reaktion von 75 % der Rezeptoren **138** und **139** bei der Verwendung von DMPC kann nur auf die deutlich herabgesetzte

Phasenübergangstemperatur T_C und der daraus resultierenden erhöhten Beweglichkeit der Bausteine **138** und **139** in der Membran zurückgeführt werden.

Der Vergleich der verwendeten Lipidmaterialien zeigt, dass auch für dieses System die Mischung aus 75 % DMPC und 25 % DPPC die besten Ergebnisse bezüglich der botenstoff-induzierten Signaltransduktion liefert, was die, in den vorigen Kapiteln gemachten Vermutungen bestätigt, dass bei diesem Mischungsverhältnis der beste Kompromiss aus Mobilität und stabilisierender Wirkung auf die eingelagerten Rezeptoren vorliegt. Aussagen über eine eventuelle Bildung von Rezeptordomänen oder der Bildung von Lipid-Rafts, die die Ergebnisse aus den Fluoreszenzexperimenten zuließen, können mit Hilfe dieses Systems nicht getroffen werden.

3.7.5 Verwendung anderer Botenstoffe

Abschließend sollten die bereits getesteten biogenen und nicht natürlichen Botenstoffe **113-120** auf ihre Anwendbarkeit im Rezeptorsystem **138/139** getestet werden. Bei den entsprechenden Signaltransduktionsexperimenten zeigte sich dieselbe Selektivität, wie bei den Experimenten mit den Transmembranrezeptoren **66** und **67** bzw. **67** und **121**. Die biogenen Dipeptide Diarginin (**118**) und Dilysin (**119**) konnten keine Signaltransduktion induzieren (Abbildung 252). Die erfolgreiche Einlagerung der Bausteine **138** und **139**, sowie die intakte Doppelmembran konnten wiederum über die Zugabe von Triphenylphosphin-3,3,3-trisulfonsäure-trinatriumsalz (**146**) nachgewiesen werden.

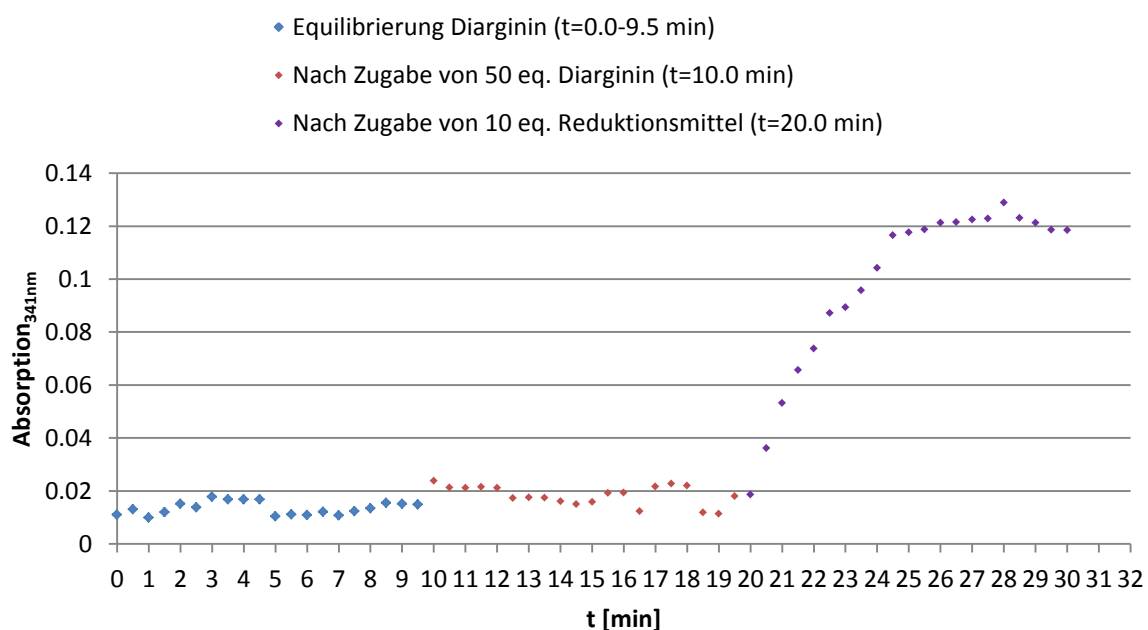


Abbildung 252: Einlagerung der Rezeptoren **138** und **139** (Je 2.5 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %) – Zeitliche Abfolge der Reagenzienzugabe (1. Zugabe von 50 eq. Diarginin (**118**); 2. Zugabe von 10 eq. Reduktionsmittel **146**).

Die Verwendung von Spermidin (**115**) als primärer Botenstoff lieferte keine aussagekräftigen Ergebnisse. Nach Zugabe von 100 eq des Polyamins **115** konnte ein Anstieg der Absorption über einen großen Wellenlängenbereich detektiert werden, der auf Trübungseffekte zurückzuführen ist. Scheinbar führt die Verwendung von Spermidin zu einer Aggregation der Liposomen, die in gepufferter wässriger Lösung nicht stabil sind.

Die sehr kompakten Polyamine EDA (**113**) und TREN (**114**) sind auch in diesem Rezeptorsystem in der Lage, ein starkes Signal über die Doppelmembran hinweg zu induzieren (Abbildung 253). Im Vergleich zu DET kann die Abspaltung des sekundären Botenstoffs 2-Thiopyridin in beiden Fällen noch einmal um etwa 5 % gesteigert werden. Die anschließende

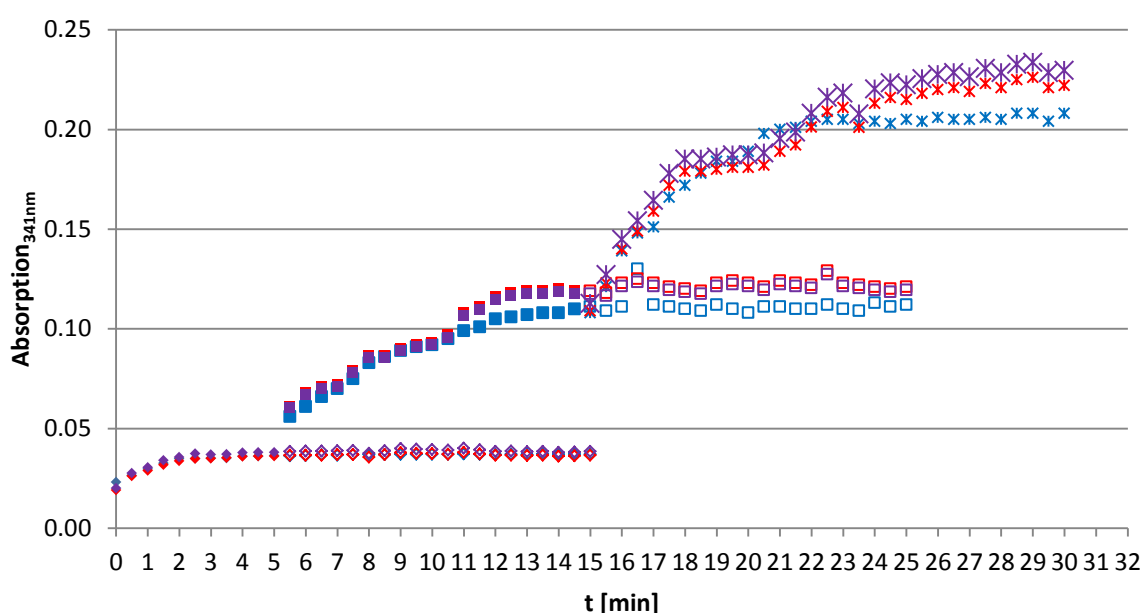


Abbildung 253: Einlagerung der Rezeptoren **138** und **139** (Je 2.5 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %) – Zeitliche Abfolge der Reagenzienzugabe (1. Zugabe von 50 eq. DET/EDA/TREN; 2. Zugabe von 10 eq. Reduktionsmittel **146**).

Reduktion der extravesikulären Disulfid-Einheiten zeigte in beiden Fällen, dass die Abspaltung des *second messengers* im Inneren des Liposoms stattgefunden hat und die Signalleitung transmembraner Natur ist. Diese Ergebnisse waren im Vorfeld der Experimente in dieser Form zu erwarten, da für die intermolekulare S_N2 -Reaktion noch geringere Abstände zwischen den Rezeptoren erreicht werden müssen, als es für die Übertragung der Energie im Falle der FRET-Paare **66/67** und **67/121** notwendig ist.

Auch für das weiterentwickelte Rezeptorsystem **138** und **139** konnte eine gerichtete, transmembrane Signaltransduktion eindeutig nachgewiesen werden. Mit Hilfe der Referenzexperimente konnten Effekte ausgeschlossen werden, die eine tatsächliche Signaltransduktion vortäuschen. Mit Hilfe der modifizierten Liposomenpräparationsmethode ist es gelungen, die bei dem System von Maue auftretende vorzeitige Desaktivierung während der Liposomenpräparation so weit zu unterdrücken und ein stabiles System zu etablieren, dass die De-

tektion der eigentlichen Signalleitung nicht überlagert. Auch das Rezeptorpaar **138** und **139** weist eine hohe Selektivität für kleine, kompakte und nicht natürlich vorkommende Polyamine als primäre Botenstoffe auf.

3.8 Synthese einer neuen Generation von Transmembranrezeptoren

Im abschließenden Teil dieser Arbeit sollte eine neue Generation von Transmembranrezeptoren weiterentwickelt werden. In einem von *Antara Dasgupta*, im Rahmen ihrer Posdoc Tätigkeit, begonnen Projekt wurde ein Signaltransduktionssystem entworfen, das durch die Funktionalisierung mit den bereits erfolgreich eingesetzten Bisphosphonat-Erkennungseinheiten zur Erkennung von kompakten Oligoaminen befähigt ist. Auf der intrazellulären Seite sollte einer der Transmembranrezeptoren mit einer geschützten Thiolgruppe funktionalisiert werden. Diese Schutzgruppe sollte unter milden Bedingungen durch Bestrahlung mit Licht abgespalten werden und so das reaktive Thiol im Liposom freisetzen (Abbildung 254 links). Der zweite Rezeptor sollte mit einem reaktiven Maleinimid-Derivat funktionalisiert werden, welches selbst keine intrinsische Fluoreszenz besitzt. Durch eine Michael-Addition, des im Liposom freigesetzten Thiols, sollte in einer chemischen Reaktion mit dem Maleinimid eine starke Fluoreszenzemission, das *second messenger* Signal, angeschaltet werden (Abbildung 254 rechts).^[255]

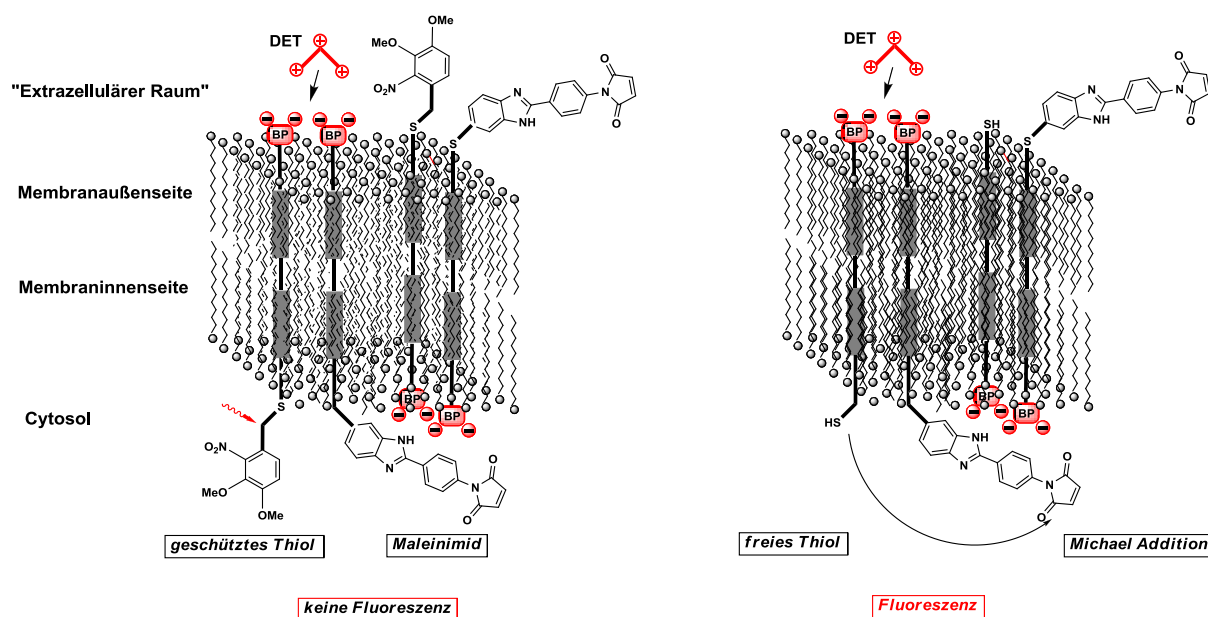


Abbildung 254: Schematische Darstellung einer neuen Generation von Transmembranrezeptoren mit Photoaktivierbarer Thiolfunktion und schaltbarem BIPM-Fluorophor.^[255]

Im Rahmen dieses Projekts sollte des Weiteren das Design des Transmembransegments dahingehend geändert werden, dass das Zentralsegment durch eine noch starrere aromatische Einheit ersetzt wird, um die gestreckte Einlagerung der Rezeptoren **149** und **150** in die Lipiddoppelschicht zu garantieren. In Abbildung 255 sind die Zielstrukturen der funktionalisierten Rezeptoren **149** und **150** mit geschützter Thiolfunktion und BIPM-Fluorophor (*N*-(*p*-(2-benzimidazolyl)phenyl)maleinimid) dargestellt. Für den Aufbau des Transmembransegments **151** wurde die gesamte bereits etablierte Synthese umgestellt.

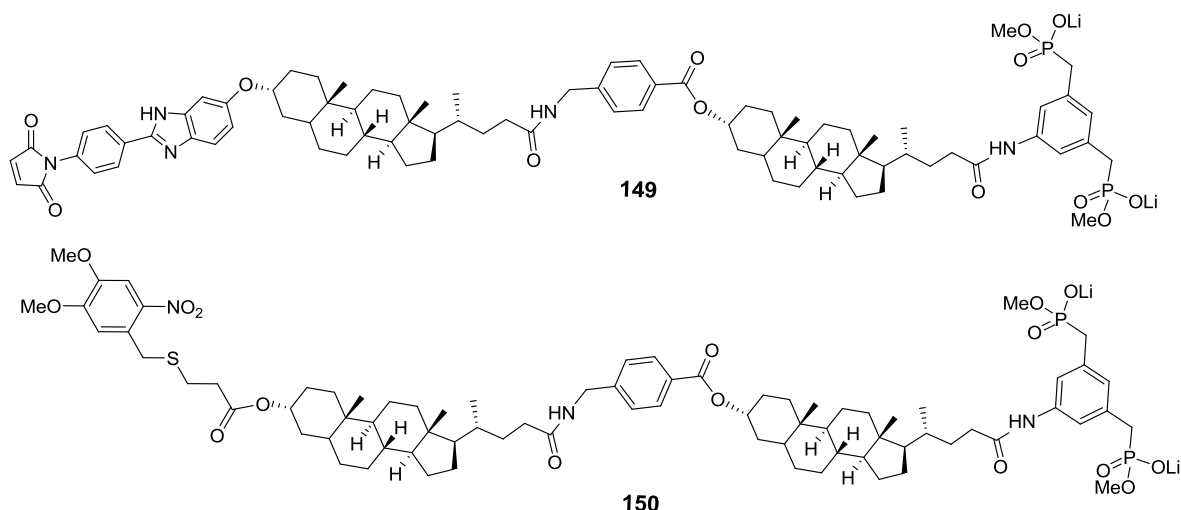


Abbildung 255: Transmembranrezeptoren **149** und **150** nach A. Dasgupta.^[255]

Die Synthesen der halben Lithocholsäure-Derivate **63** und **156** erfolgten weitgehend nach den bekannten Protokollen. Die Anknüpfung der *second messenger*-Funktionen wurde über die sekundäre Alkoholfunktion der Lithocholsäure (**63**) bewerkstelligt. Die starre Dialkin-Einheit, für die eine gestreckte Einlagerungsgeometrie im Rahmen dieser Arbeit bereits bewiesen werden konnte, wurde gegen eine 4-Benzylaminobenzoessäure-Einheit **152** ausgetauscht. Hieraus resultierte eine Desymmetrisierung des gesamten membrandurchspannenden Rezeptorgerüsts **151**. Die sehr flexible Seitenkette des halben Lithocholsäure-Derivats

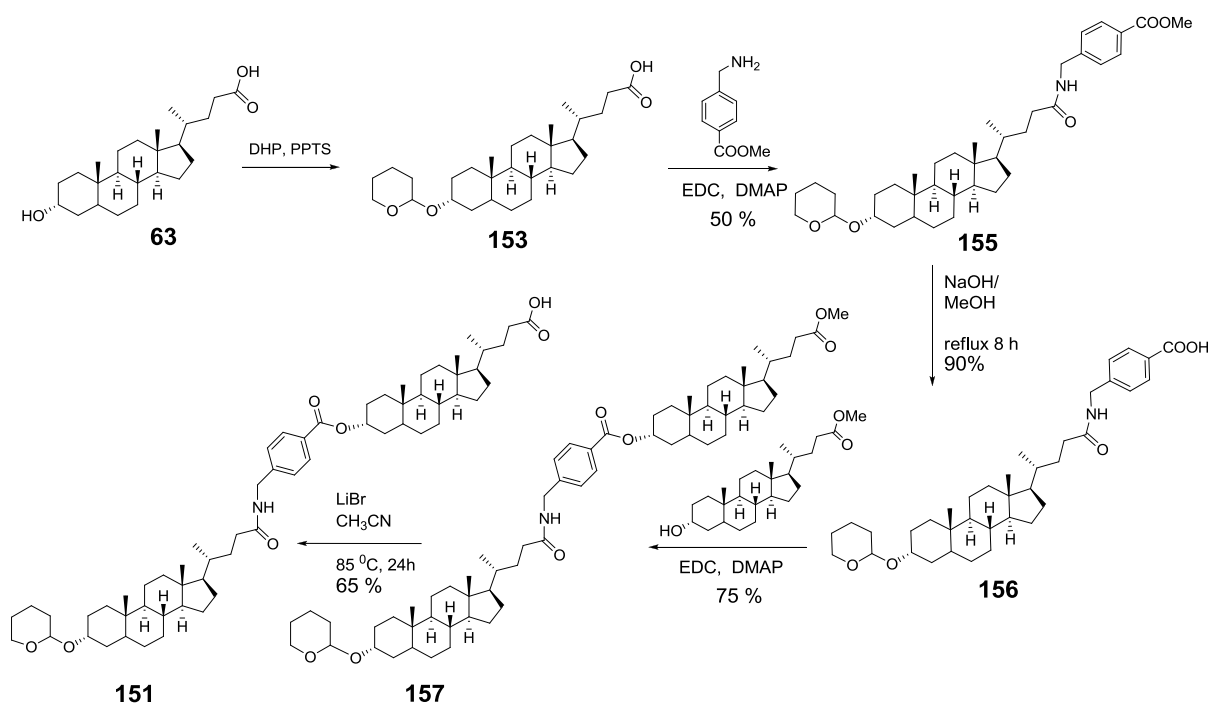


Abbildung 256: Syntheschema der transmembranen Gerüsteinheit nach A. Dasgupta.^[255]

ats **153** wurde zur Funktionalisierung mit der Amino-Bisphosphonat-Pinzette **154** genutzt und die Hydroxy-Funktion wurde an die aromatische Zentral-Einheit **152** angeknüpft. Die

vollständige Syntheseroute ist in Abbildung 256 dargestellt. Allerdings ergaben sich einige synthetische Probleme. Die Spaltung des Methylesters **157** konnte erst nach langer Optimierung der Bedingungen erreicht werden. Zudem stellte die Anknüpfung der Bisphosphonat-Einheit **154** neben beträchtlichen Reinigungsproblemen der Intermediate ein weiteres Problem dar. Schlussendlich konnte das modifizierte Transmembrangerüst **151** nicht in reiner Form isoliert werden.

In weiteren Arbeiten wurde versucht ein Photolyseassay zu etablieren, mit dessen Hilfe gewährleistet werden sollte, dass die photolabile Schutzgruppe unter milden Bedingungen entfernt und die Thiolfunktion des Transmembranrezeptors **150** vollständig freigesetzt wird. Im Vorfeld wurde die Modellverbindung **158** synthetisiert und erste Photolyseexperimente durchgeführt (Abbildung 257). Hierzu wurde die Verbindung **158** in verschiedenen Konzentrationen in Methanol gelöst und anschließend in einem Rayonett Photoreaktor mit einer Quecksilberlampe (1000 Watt) bestrahlt. Es zeigte sich, dass die Verbindung **158** nach einem Zeitraum von 24 h nur mit einem mäßigen Umsatz von 50 % zum freien Thiol **159** entschützt werden konnte. Bei der Photolyse kam es zur Bildung von zahlreichen Nebenprodukten. Auch durch Veränderung der Reaktionszeit und Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen konnte kein funktionierender Photolyseassay etabliert werden.

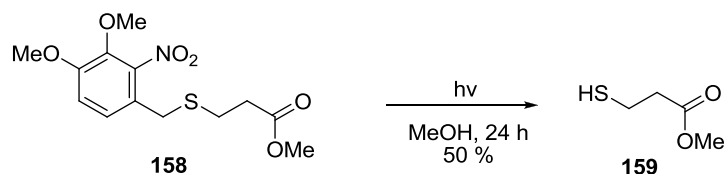


Abbildung 257: Photoinduzierte Entschützung der Modellverbindung **158** zum freien Thiol **159**.^[255]

Für die Anknüpfung des BIPM-Fluorophors sollte nach einer literaturbekannten Vorschrift von *Kanaoka et al.* eine Bromo-BIPM-Derivat **160** synthetisiert werden, welches später

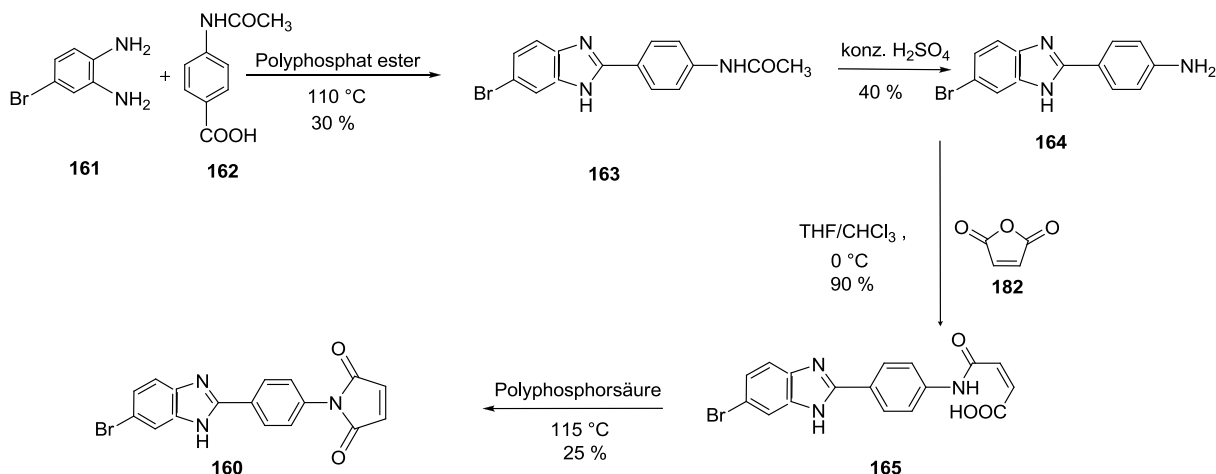


Abbildung 258: Synthese des Bromo-BIPM-Fluorophors **160**.

über eine Kupfer-vermittelte Buchwald-Reaktion mit dem Transmembrangrundgerüst **151** verbunden werden sollte.^[255,256] Durch die in Abbildung 258 dargestellte Synthese konnte das Derivat **160** in akzeptablen Ausbeuten isoliert werden. In nachfolgenden Modellreaktionen zeigte sich allerdings, dass das Derivat **160** durch Übergangsmetall-vermittelte Kreuzkuppelungsreaktionen nicht an das Transmembransegment **151** angeknüpft werden kann.

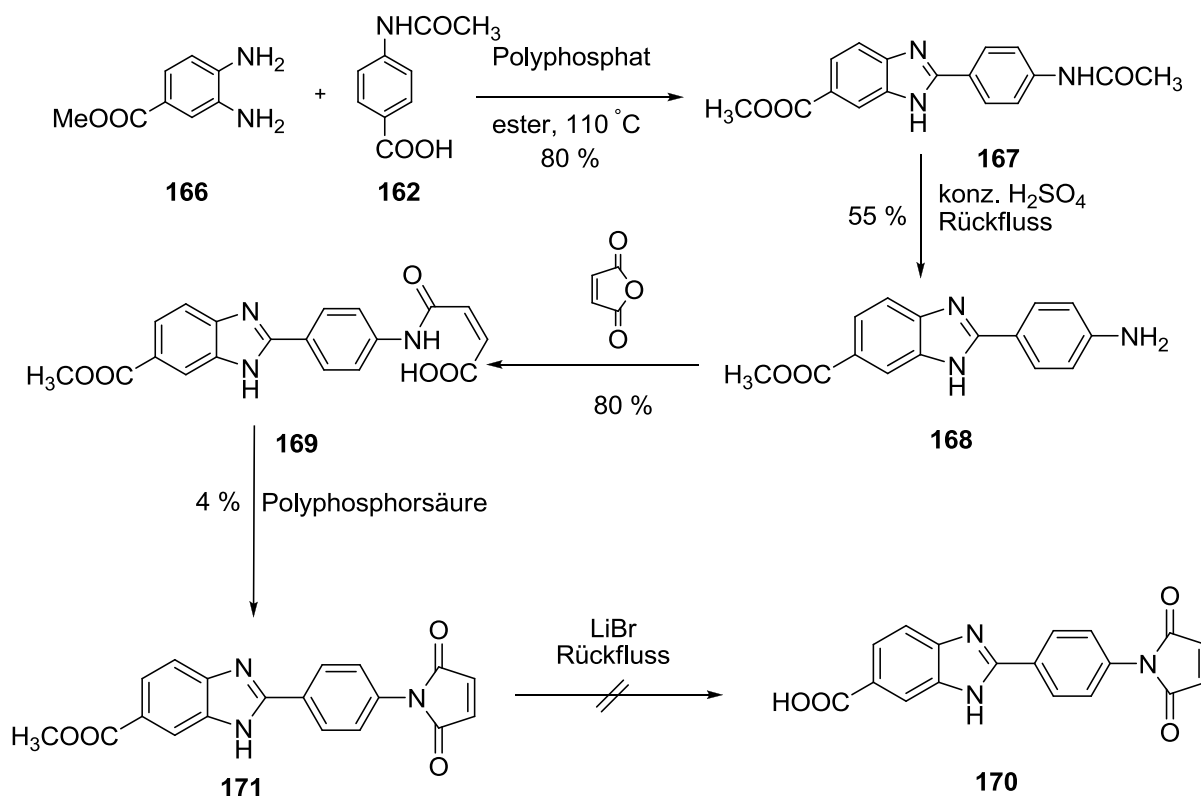


Abbildung 259: Synthese des Carbonsäure-BIPM-Fluorophors **170**.

Zu diesem Zweck wurde eine alternative Syntheseroute eingeschlagen. Ausgehend von 2,3-Diaminobenzoesäuremethylester **162** sollte eine Carbonsäure-BIPM-Derivat synthetisiert werden, welches im Folgenden über eine einfache Veresterung mit der sekundären Alkoholfunktion des Lithocholsäureanalogas **151** verbunden werden sollte (Abbildung 257). Hierbei lieferte die Ringschlussreaktion das Maleinimid **171** nur in sehr schlechten Ausbeuten. Über die abschließende Spaltung des Methylesters **171** mit Lithiumbromid konnte das Carbonsäure-Derivat allerdings nicht erhalten werden, da es bei dieser Reaktion stets zu einer Michael-Addition des Bromidions an die Doppelbindung des Maleinimids **170** kam.

Ausgehend von diesen Ergebnissen sollte im Rahmen dieser Arbeit versucht werden, eine photolabile Schutzgruppe für die Thiofunktion zu synthetisieren, die es ermöglicht, unter milden Bedingungen und kurzen Reaktionszeiten das geschützte Thiol wieder freizusetzen. Bei erfolgreicher Synthese sollte zuerst über einen Photolyseassay versucht werden, die Thiofunktion in organischer Lösung freizusetzen. Im Falle eines etablierten Assays soll-

ten diese Ergebnisse dann auf eine Modellverbindung, die zur Einlagerung in Liposomen befähigt ist, übertragen werden. Abschließend ist angedacht, einen modifizierten Rezeptor zu synthetisieren, der in späteren Signaltransduktionsexperimenten eingesetzt werden kann. Nach gründlicher Literaturrecherche konnte eine Methode von *Smith et al.* gefunden werden, die es zum einen ermöglicht mit Hilfe einer *o*-Nitrobenzylschutzgruppe verschiedene geschützte Thiolderivate in einer einfachen Reaktionssequenz zugänglich zu machen und zum anderen diese Derivate wiederum in organischer, als auch in gepufferter wässriger Lösung wieder freizusetzen und mit Nucleophilen zu funktionalisieren (Abbildung 260).^[213]

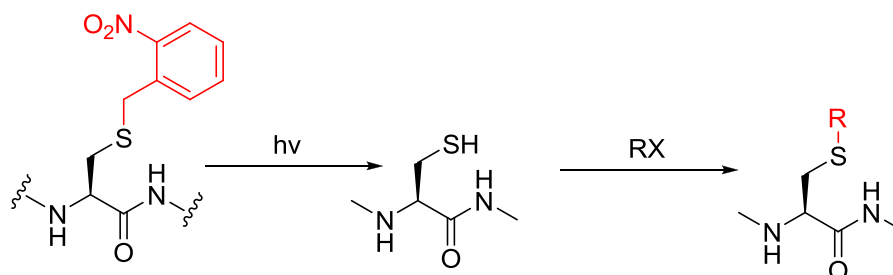


Abbildung 260: Photolabile *o*-Nitroschutzgruppe nach Smith et al.^[213]

Über das kommerziell erhältliche *ortho*-Nitrobenzylbromid sollten die in Abbildung 261 gezeigten Zielstrukturen zugänglich gemacht werden.

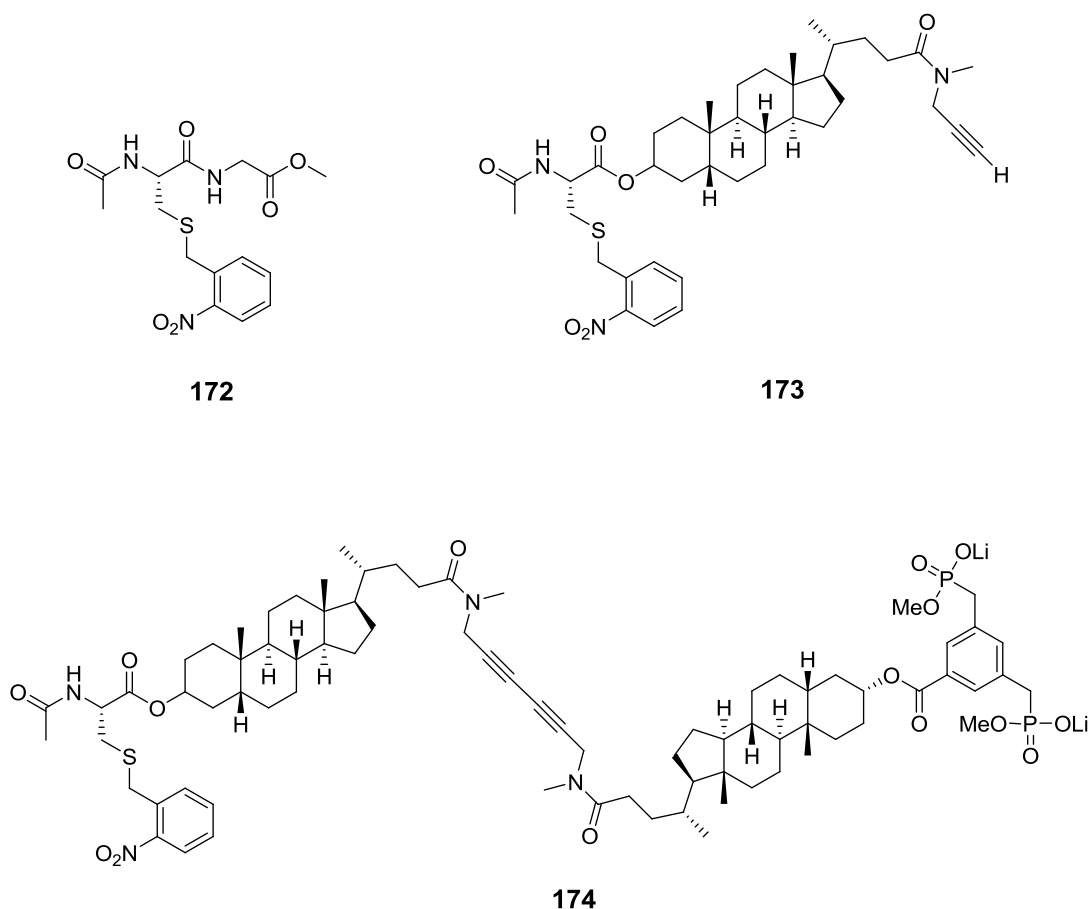


Abbildung 261: Neue Zielstrukturen mit *ortho*-Nitrobenzyl-Schutzgruppe.

Für die Synthese des BIPM-Fluorophors sollte ebenfalls eine alternative Synthese erarbeitet werden, die zum einen die Ausbeuten der Ringschlussreaktion zum Maleinimid **171** verbessert und zum anderen die Reaktionssequenz geändert werden, um eine Anknüpfung an das transmembrane Gerüstelement **65** zu ermöglichen. Bei der Synthese der Transmembranrezeptoren sollte auf das, im Rahmen dieser Arbeit etablierte, dimere Transmembrangerüst **65** zurückgegriffen werden, da so der synthetische Aufwand möglichst gering gehalten werden kann. Die Zielstrukturen der überarbeiteten Rezeptoren **174** und **175** auf Grundlage des Gerüstbausteins **65** sind in Abbildung 262 dargestellt.

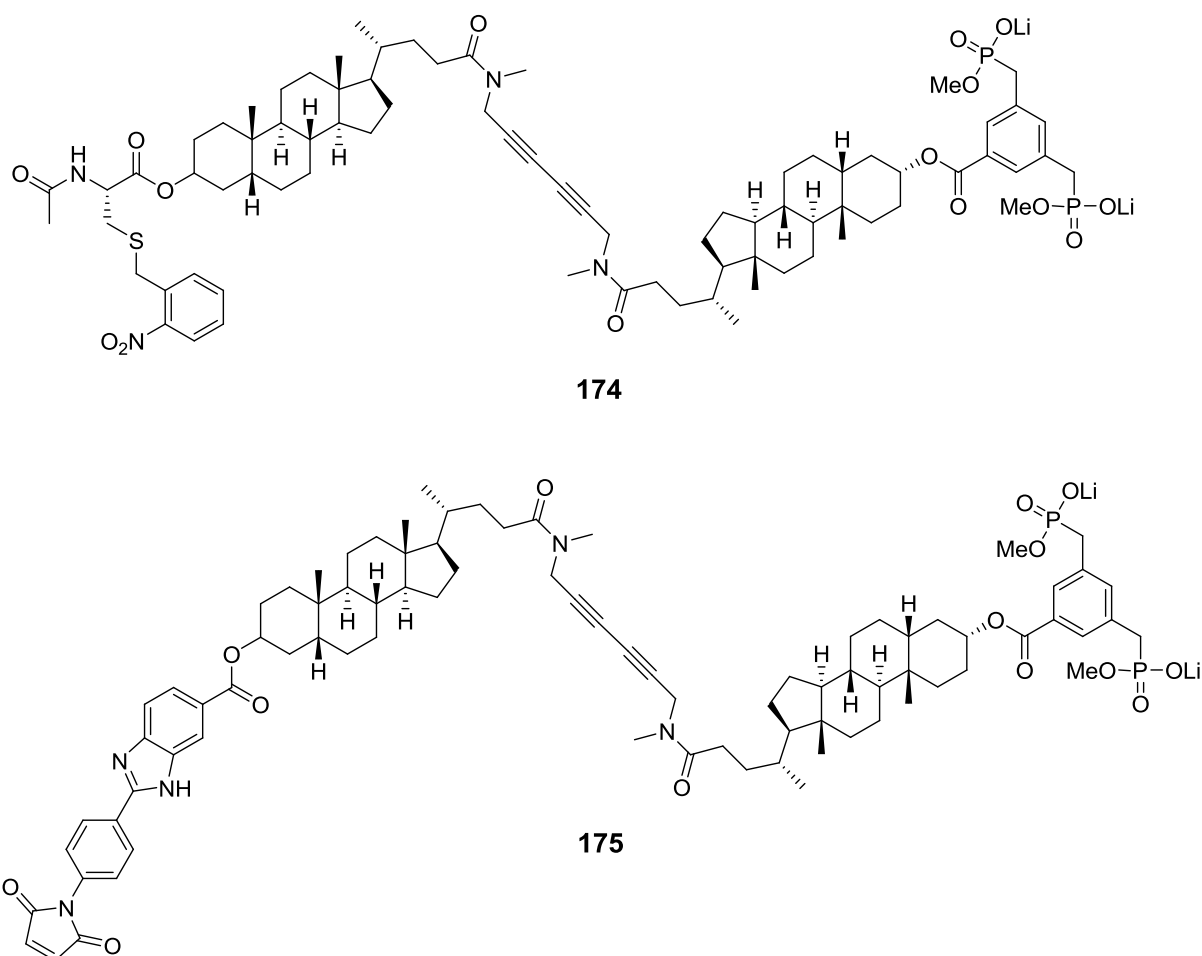


Abbildung 262: Zielstrukturen der modifizierten Transmembranrezeptoren **174** und **175** auf Grundlage des Gerüstbausteins **65**.

3.8.1 Synthese der Modellverbindung 172 mit photolabiler *o*-Nitrobenzyl-Schutzgruppe

Um störende Nebenreaktionen, verursacht durch die freie Säurefunktion des Cysteinderivats **172** bei den geplanten Photolyseexperimenten ausschließen zu können, wurde im ersten Schritt der Synthese der Modellverbindung **172** *N*-Acetyl-*S*-trityl-cystein mit Glycinmethylester hydrochlorid unter Verwendung von HCTU/Cl-HOBt zu Dipeptid gekuppelt. Das Dipeptid konnte durch einfache säulenchromatographische Reinigung isoliert und in guten Ausbeuten erhalten werden. Die Anknüpfung der photolabilen *o*-Nitrobenzyl-

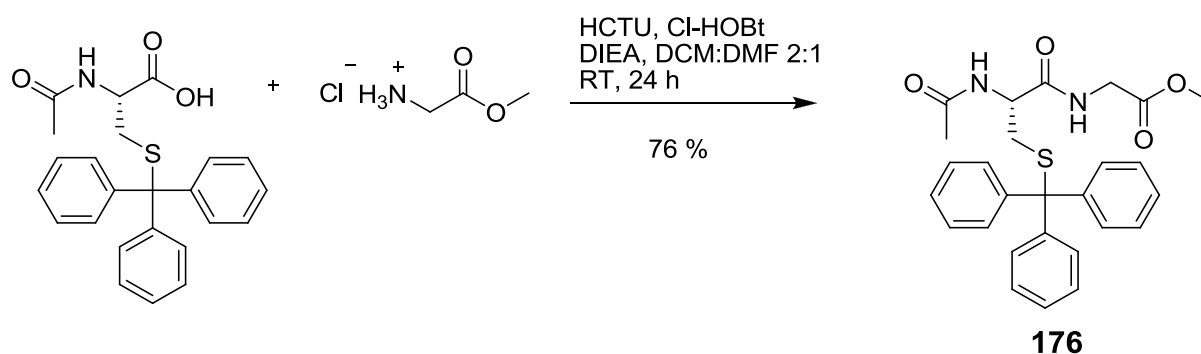


Abbildung 263: Synthese der Modellverbindung 172 (1).

Schutzgruppe sollte in einer Eintopfreaktion, die in ähnlicher Form bereits bei der Synthese des Disulfid-Rezeptors **139** erfolgreich durchgeführt wurde, erfolgen. Das Intermediat **176** wurde unter Verwendung von Triisopropylsilan als Kationenfänger in einem Gemisch Dichlormethan und Trifluoressigsäure zu freiem Thiol entschützt und die überschüssige Trifluoressigsäure anschließend mit Benzol im azeotropen Gemisch entfernt. Das Rohprodukt wur-

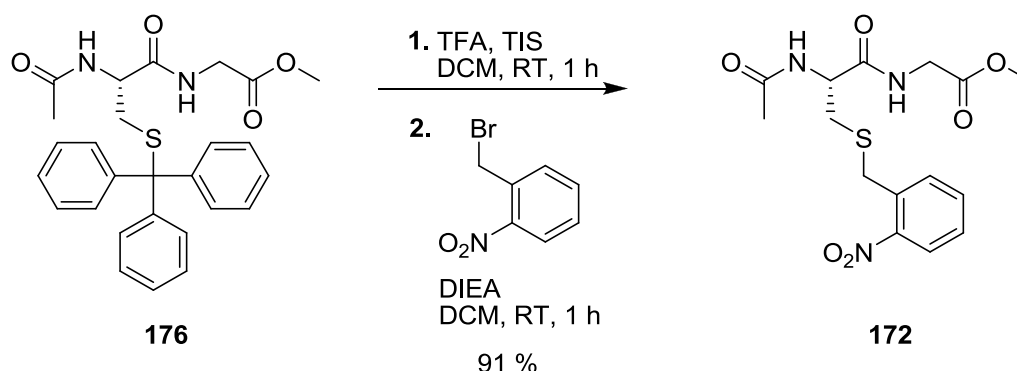


Abbildung 264: Synthese der Modellverbindung 172 (2).

de ohne weitere Aufreinigung mit einem Überschuss an *o*-Nitrobenzylbromid unter Verwendung von DIEA als Hilfsbase umgesetzt. Die Modellverbindung **172** konnte durch einfache Gelfiltration in hohen Ausbeuten erhalten werden.

3.8.2 Vorexperimente mit der Modellverbindung 172

In dem von *Smith et al.* entwickelten Photolyseassay wird als Photolysepuffer ein 1:1-Gemisch aus Acetonitril und PBS-Puffer (0.01 M) verwendet, um alle Reagenzien und das Substrat in einer homogen Phase zu lösen und das photochemisch erzeugte *S,O*-Acetal **177** zu hydrolisieren (Abbildung 265). Dem Photopuffer werden, bezogen auf den Gehalt an Photosubstrat 2 eq. L-(-)-Ascorbinsäure und 5 eq. Semicarbazid hydrochlorid zugesetzt. Die L-(-)-Ascorbinsäure wird als Antioxidationsmittel für das entstehende freie Thiol eingesetzt, um die Bildung entstehender Nebenprodukte zu unterdrücken. Das Semicarbazid dient als Scavenger für das durch die Photolyse entstehende 2-Nitroso-benzaldehyd **178**. Durch das Abfangen des Zwischenprodukts kann das Gleichgewicht der Hydrolysereaktion auf die Seite des freien Thiols **179** verschoben werden und eine Rückreaktion zum *S,O*-Acetal **177** vollständig unterdrückt werden.^[213]

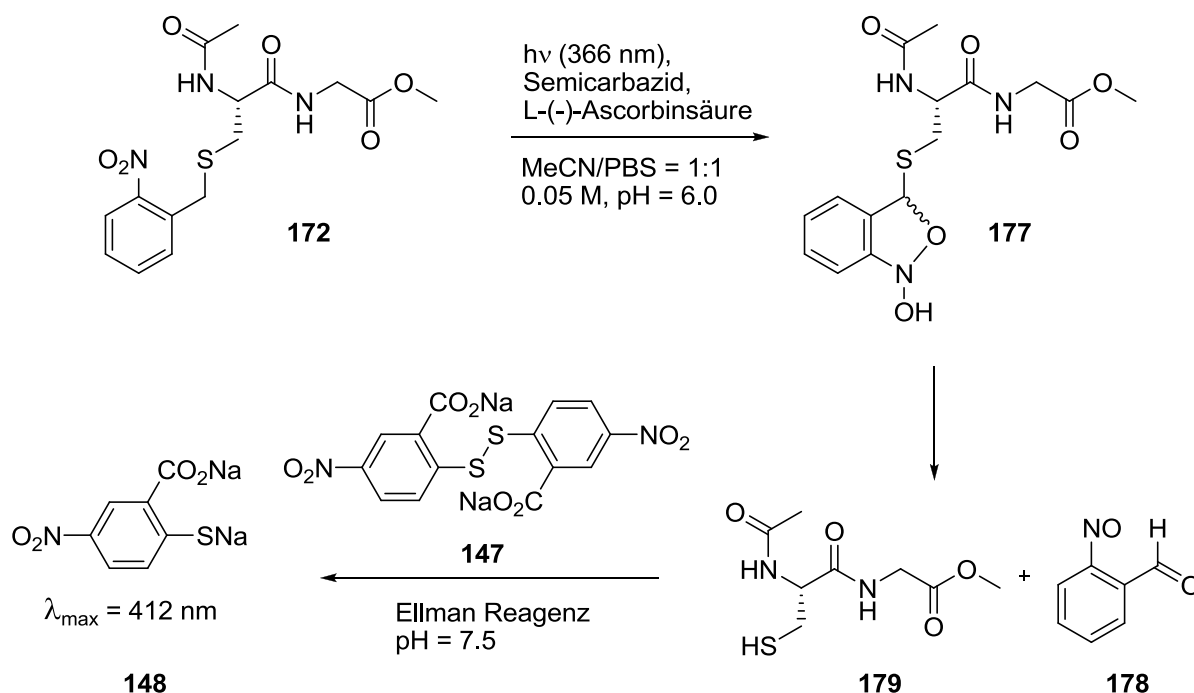


Abbildung 265: Abspaltung der *ortho*-Nitrobenzyl-Schutzgruppe und Detektion der freigesetzten Thiolgruppen.

Für das eigentliche Experiment wurde das Photosubstrat **172** mit einer Konzentration von 10^{-4} mol/l in dem Photolysepuffer gelöst und in eine Mikrotiterplatte überführt. Zehn Proben mit einem Volumen von $300 \mu\text{L}$ wurden über einen Zeitraum von 80 min mit einer handelsüblichen UV-Lampe im Abstand von 0.5 cm bei einer Wellenlänge von 366 nm bestrahlt. Alle 1-5 min wurde ein Aliquot von $150 \mu\text{L}$ aus den Wells entnommen und mit $150 \mu\text{L}$ Ellman's Reagenz **147** (1 mg/mL Dithionitrobenzoesäure) versetzt. Das Ellman Reagenz **147** dient zur Detektion der freigesetzten Thiolgruppen, da dieses mit den Thiolen quantitativ

unter Abspaltung von 2-Thio-5-nitrobenzoesäure **148** (412 nm) reagiert (Abbildung 265).^[257] Aus dem Anstieg der Absorption bei 412 nm kann über eine Kalibrierungsfunktion der zeitliche Umsatz der Photolyse bestimmt werden. Die zeitliche Freisetzung der Thiofunktionen aus dem Photosubstrat **172** ist in Abbildung 266 dargestellt. Die Halbwertszeit der Photoreduktion beträgt 5.5 min. Eine Freisetzung von über 90 % der Thiofunktion ist nach etwa 35 min erreicht.

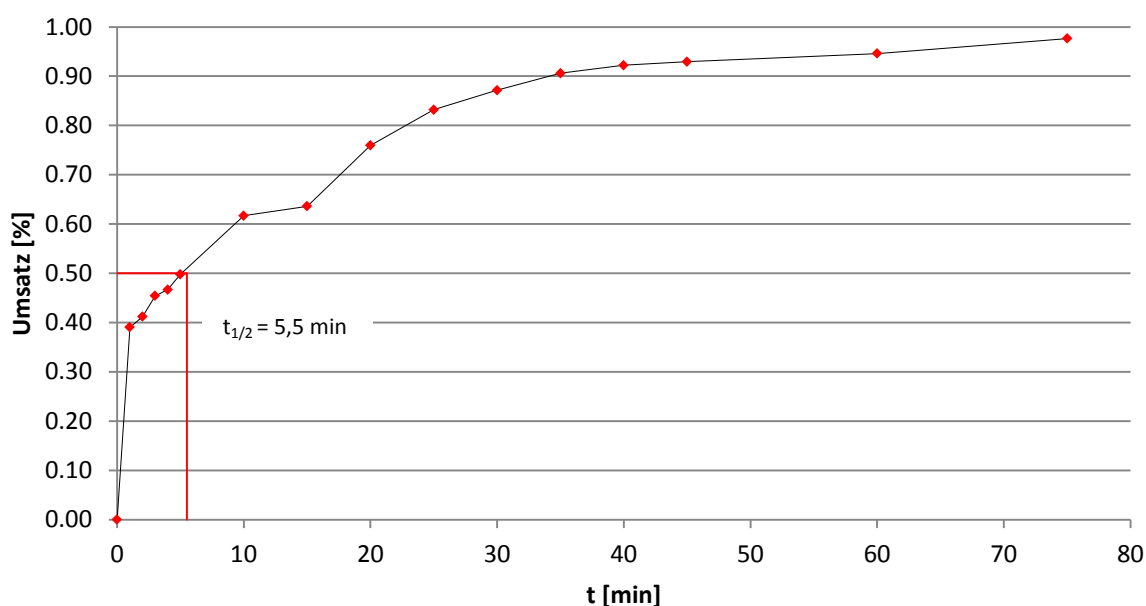


Abbildung 266: Umsatz der Photolyse von **172** in Photopuffer 2 (spektroskopisch gemessen via Ellman's Assay).

Mit Hilfe dieser sehr milden Methode konnte gezeigt werden, dass eine Abspaltung der Photoschutzgruppe **178** ohne großen apparativen Aufwand im Microtiterplattenmaßstab möglich ist. Die Zeit, die für die Freisetzung der Thiofunktionen nötig ist, bewegt sich in einem Zeitfenster, in dem auch die eigentlichen Signaltransduktionsexperimente durchgeführt werden sollen. Durch diese ersten positiven Ergebnisse ermutigt, sollte im Folgenden die Modellverbindung **173** synthetisiert werden und im Anschluss versucht werden, diese, nach Einlagerung in DMPC/DPPC-Liposomen, der Photolysereaktion zu unterziehen.

3.8.3 Synthese des halben Transmembransegments 173 mit photolabiler Schutzgruppe

Die Synthese des zur Einlagerung in Liposomen vorgesehen Transmembransegments 173 mit *o*-Nitrobenzyl-Schutzgruppe konnte durch die, bei der Synthese der Modellverbindung 172 etablierte Reaktionssequenz, ausgehend vom bereits bekannten Baustein

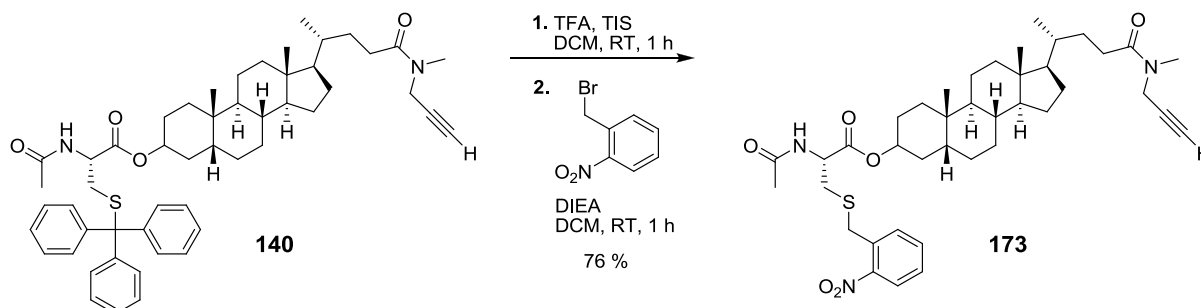


Abbildung 267: Synthese des Transmembransegments 173.

140 bewerkstelligt werden. Durch saure Entschützung und direkte Umsetzung zum Nitrobenzyl-Derivat konnte das funktionalisierte Transmembransegment **173** in hoher Reinheit und guten Ausbeuten erhalten werden. Abbildung 268 zeigt das ¹H-NMR-Spektrum der Modellverbindung **173**.

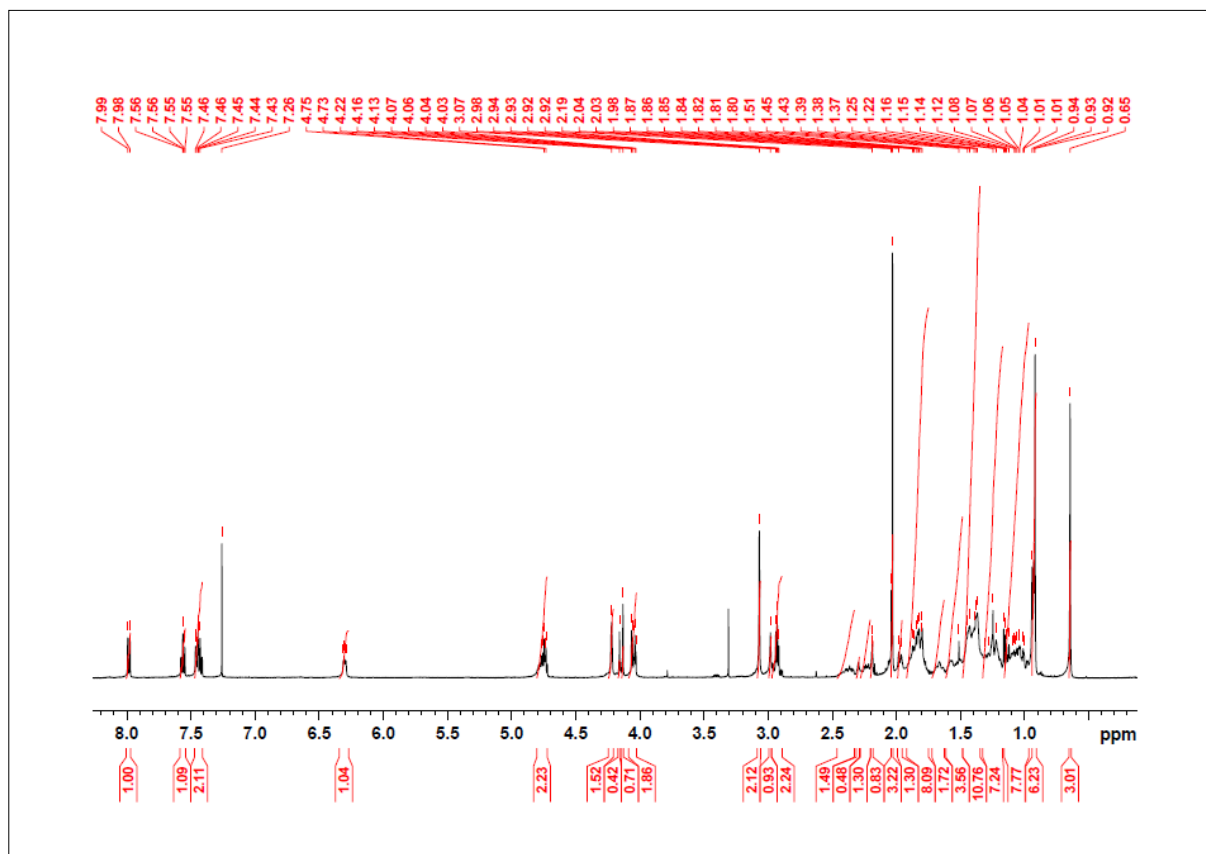


Abbildung 268: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): N-Acetyl-cystein-(S-*o*-nitrobenzyl)-lithocholsäure-N-methylpropargylamid 173.

3.8.4 Vorexperimente mit dem halben Membransegment 173 in DMPC/DPPC-Liposomen

Für die folgenden Experimente wurden DMPC/DPPC-Liposomen (75 %/25 %) nach dem Extrusionsverfahren mit einer Dotierung von 5 % der Modellverbindung **173** präpariert (3.3.3.2). Die anschließenden Photolyseexperimente mit den dotierten Liposomen wurden analog der zuvor beschriebenen Vorschrift 3.8.2 durchgeführt. Auch im Fall dieses Experiments zeigte sich, dass die Abspaltung unter den milden Bedingungen im Mikrotiterplattenmaßstab ohne weitere Probleme durchgeführt werden kann. Die Halbwertszeit betrug in diesem Fall sogar nur 2 min. Eine fast vollständige Freisetzung der Thiolfunktion des Photosubstrats **173** war ebenfalls nach etwa 30 min erfolgt (Abbildung 269).

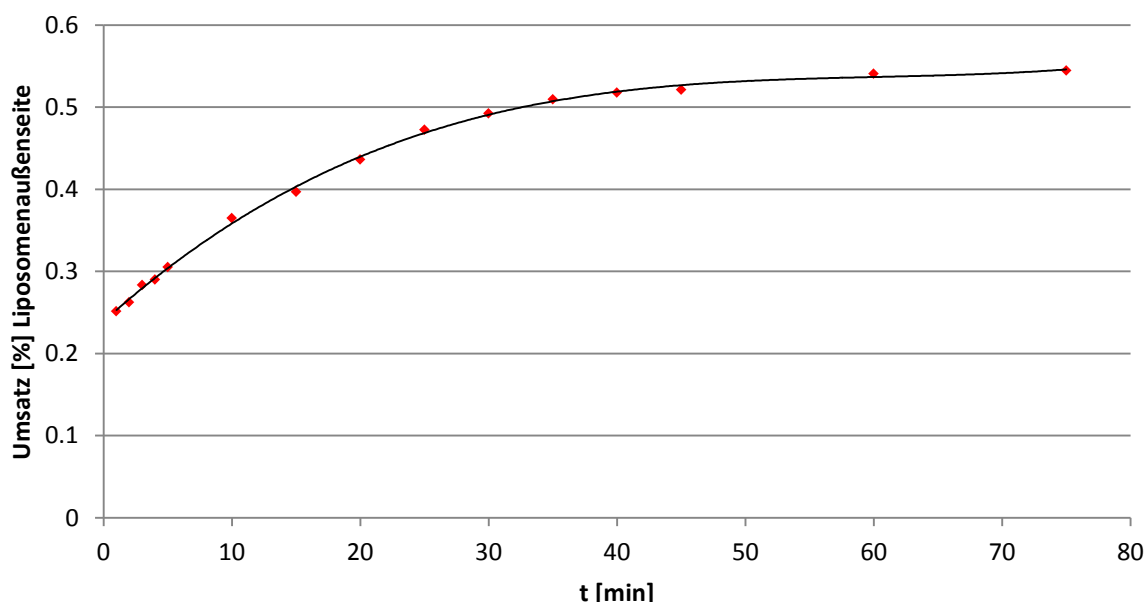


Abbildung 269: Umsatz der Photolyse des halben Bausteins **173** in Photopuffer 3 (spektroskopische gemessen via Ellman's Assay).

Zu beachten ist, dass der detektierte Umsatz pro Zeiteinheit nur die Hälfte der tatsächlichen Freisetzung beträgt, da das Ellman's Reagenz **147** nur die auf der Außenseite der Membran freigesetzten Thiole detektieren kann, da es selbst nicht membrangängig ist. Da der Assay ohne Probleme auf die membrangebundene Verbindung **173** übertragen werden konnte, sollte nun der Transmembranbaustein **174** syntetisiert werden, der später entweder in Kombination mit dem bereits erfolgreich hergestellten Rezeptor **139** oder in Kombination mit dem BIPM-funktionalisierten Rezeptor **175** in Signaltransduktionsexperimenten eingesetzt werden kann.

3.8.5 Synthese des Rezeptors **174** mit photolabiler *o*-Nitrobenzyl-Schutzgruppe

Die Synthese des Rezeptors **174** sollte ausgehend von der bereits vorhandenen Verbindung **143** erfolgen. Der Rezeptorvorläufer **143** wurde in der etablierten Eintopfreaktion mit *ortho*-Nitrobenzylbromid, nach vorangegangener saurer Entschützung mit TFA/TIS umgesetzt. Das Intermediat **180** mit photolabiler Thiolschutzgruppe konnte durch einfache säulenchromatographische Reinigung in guten Ausbeuten erhalten werden (Abbildung 270).

Die anschließende Spaltung des Phosphonsäuremethylesters **180** mit LiBr in Acetonitril lieferte allerdings ausschließlich das Lithiumsalz des Rezeptors **138** mit freier Thiolfunktion. In Testreaktionen konnte gezeigt werden, dass die *ortho*-Nitrobenzyl-Schutzgruppe unter diesen Reaktionsbedingungen bereits bei einer Temperatur von 50 °C und einer Reaktionszeit von 4 h vollständig von der abgespalten wird (Abbildung 271).

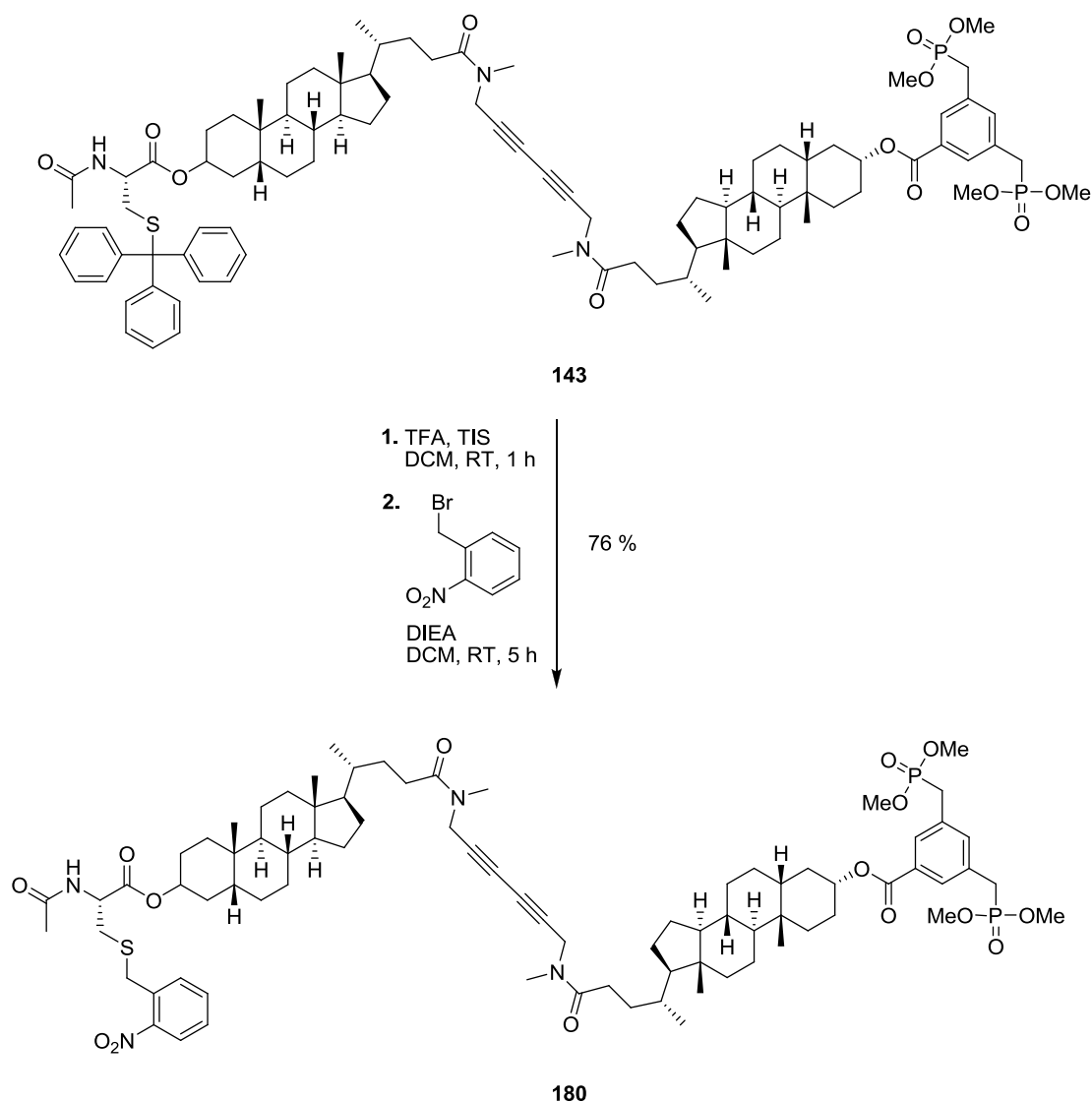


Abbildung 270: Funktionalisierung des Rezeptorvorläufers **180** mit der *ortho*-Nitrobenzy-Schutzgruppe.

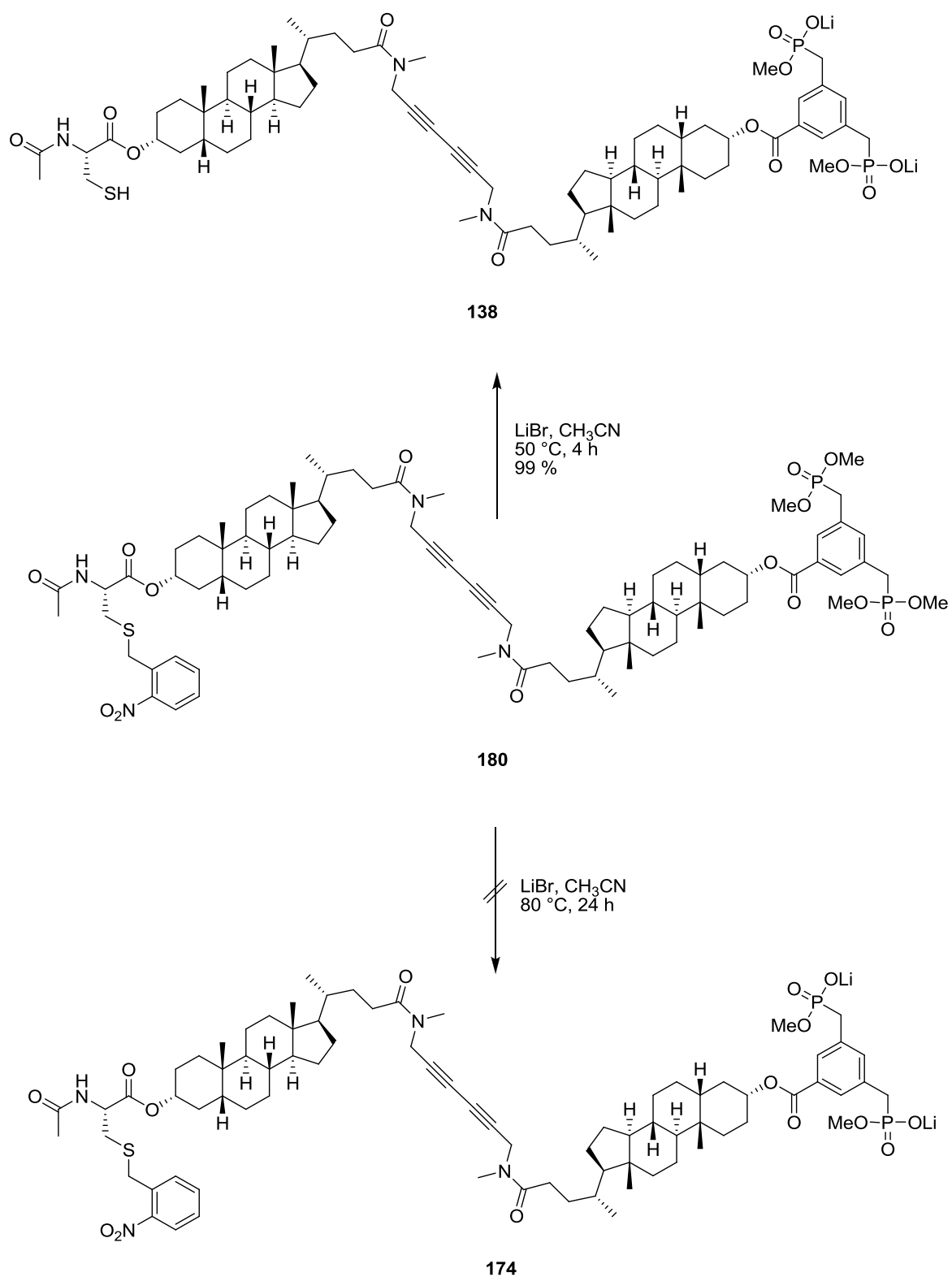


Abbildung 271: LiBr-Spaltung des Transmembranbausteins 180 mit photolabiler *o*-Nitrobenzyl-Schutzgruppe.

In einer alternativen Reaktionssequenz wurde an dem Transmembranbaustein **143** zuerst die Tritylschutzgruppe unter sauren Bedingungen entfernt und der erhaltene Baustein säulenchromatographisch gereinigt. An der bereits bekannten Verbindung **144** wurden anschließend zuerst die Phosphonsäuremethylester mit LiBr nach dem Standardprotokoll gespalten. Die ebenfalls bekannte Verbindung **138** wurde ohne weitere Aufreinigung mit *ortho*-Nitrobenzylbromid umgesetzt (Abbildung 272). Hierbei konnte ein Umsatz von etwa 60 % über ^1H -NMR-Spektren ermittelt werden. Aufgrund der bereits gespaltenen Phosphonsäuremethylester konnte der Rezeptor **174** nicht säulenchromatographisch von den Verunreinigungen getrennt werden. Die Trennung über *reversed-phase* Kieselgel war ebenfalls nicht

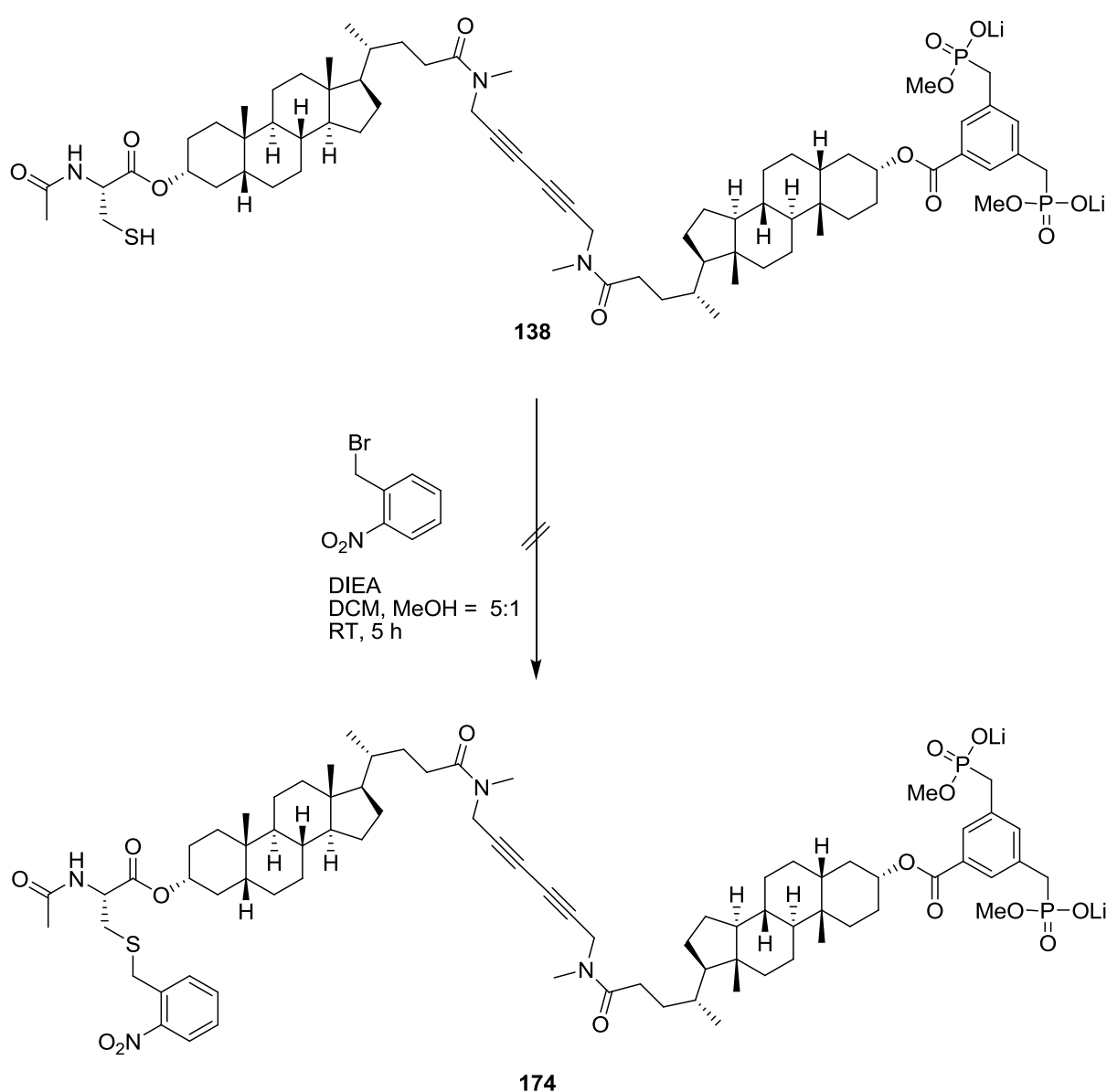


Abbildung 272: Synthese der Transmembranbausteins **174** mit photolabiler *o*-Nitrobenzyl-Schutzgruppe II.

nicht möglich. Somit stand der Rezeptor **174** für spätere Signaltransduktionsexperimente nicht zur Verfügung.

3.8.6 Synthese des Carboxy-BIPM-Fluorophors 170

Wie bereits einleitend erwähnt, sollte die Synthese des BIPM-Fluorophors **170** im Bezug auf höhere Ausbeuten und auf eine, zur Anknüpfung an das Zentralsegment **65** zur Verfügung stehende, funktionelle Gruppe verbessert werden. Auf Grundlage der literaturbekannten Synthesevorschrift von *Kanaoka et al.* und auf Vorarbeiten von *Dasgupta* wurde im ersten Schritt der Synthese 3,4-Diaminobenzoesäuremethylester (**166**) mit 4-Acetamidobenzoesäure (**162**) zum Benzimidazol **167** umgesetzt.^[255,256] Die Verwendung von Trimethylsilylpolyphosphat als Lösungsmittel und säurekatalytisches Äquivalent, lieferte das Benzimidazol-Derivat **167** in kurzen Reaktionszeiten und akzeptablen Ausbeuten (Abbildung 273).

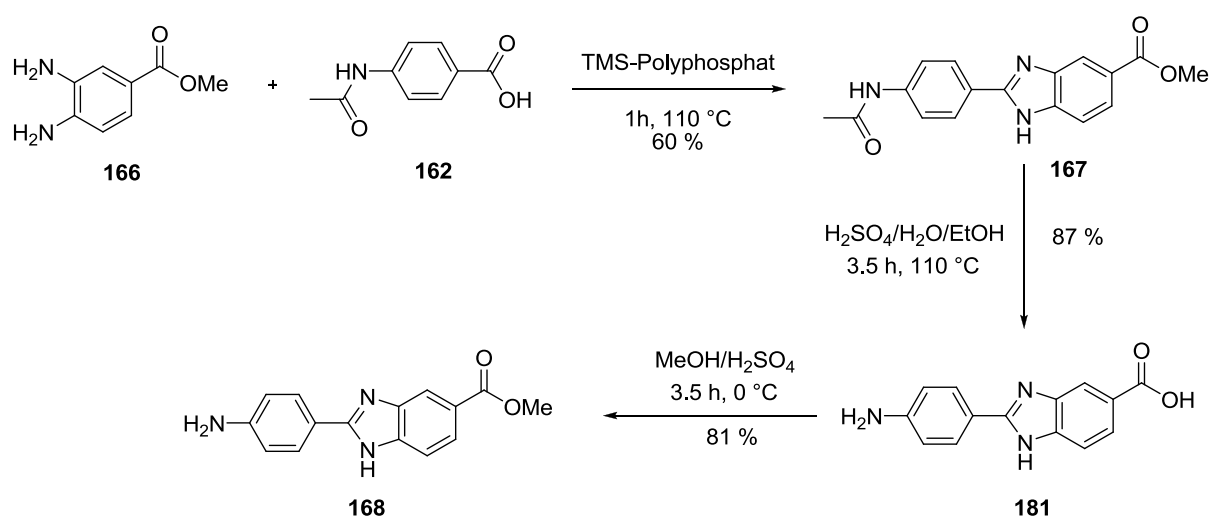


Abbildung 273: Syntheseroute 1 zur BIPM-Kopfgruppe 170 – Teil 1.

An der so erhaltenen Verbindung **167** wurden in der nächsten Stufe die Acetyl-schutzgruppe und der Methylester in einem Schritt, unter Verwendung eines Gemischs aus Wasser/Ethanol und konzentrierter Schwefelsäure, unter Rückfluss gespalten. An dem entschützten zwitterionischen Benzimidazol-Derivat **181** musste in einem zusätzlichen Schritt die Carbonsäurefunktion wieder unter Schwefelsäure-Katalyse in Methanol als Methylester **168** geschützt werden, um Nebenreaktionen bei der Ringschlussreaktion in der übernächsten Stufe zu vermeiden (Abbildung 274). Der Methylester **168** wurde im Folgenden unter den literaturbekannten Reaktionsbedingungen mit Maleinsäureanhydrid **182** in einem Gemisch aus Dichlormethan und Tetrahydrofuran zum Intermediat **169** umgesetzt. Zu dem Reaktionsgemisch wurden nach einer Reaktionszeit von 30 min 1 eq. DIC (*N,N'*-Diisopropylcarbodiimid) und katalytische Mengen 4-DMAP zugegeben und das Gemisch für weitere 10 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach säulenchromatographischer Reinigung konnte das BIPM-Derivat **171** mit einer Ausbeute von 87 % über beide Stufen erhalten werden. Im Vergleich dazu lieferte die Reaktion in siedender Polyphosphorsäure lediglich eine

Ausbeute von 4 %, [255,256]

An dem bekannten BIPM-Derivat **171** sollte zur Anknüpfung an das Transmembransegment **65** der Methylester gespalten werden. In den Arbeiten von *Dasgupta* hatte sich bereits gezeigt, dass diese Spaltung eine kritische Stufe dieser Synthese darstellt. Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte die Spaltung nicht zufriedenstellend bewältigt werden. Weder die Verwendung von LiBr in Acetonitril, Natriumhydroxid in Methanol/Wasser, Lithiumhydroxid in Methanol oder Wasser und Kaliumhydroxid in Methanol/Wasser bei unterschiedlichen Temperaturen führten zu der erwünschten Entschützung der Carbonsäurefunktion **170**. Lediglich durch die Verwendung von Lithiumhydroxid in einem 3:1:1-Gemisch aus Wasser/Methanol/Tetrahydrofuran konnte der Methylester **171** gespalten werden. Allerdings zeigten NMR-spektroskopische Untersuchungen, dass unter diesen Reaktionsbedingungen etwa 50 % eines Michael-Adukts entstanden sind, welches im Folgenden durch das Vorhandensein der freien Carbonsäurefunktion nicht mehr von der Zielverbindung **170** getrennt werden konnte.

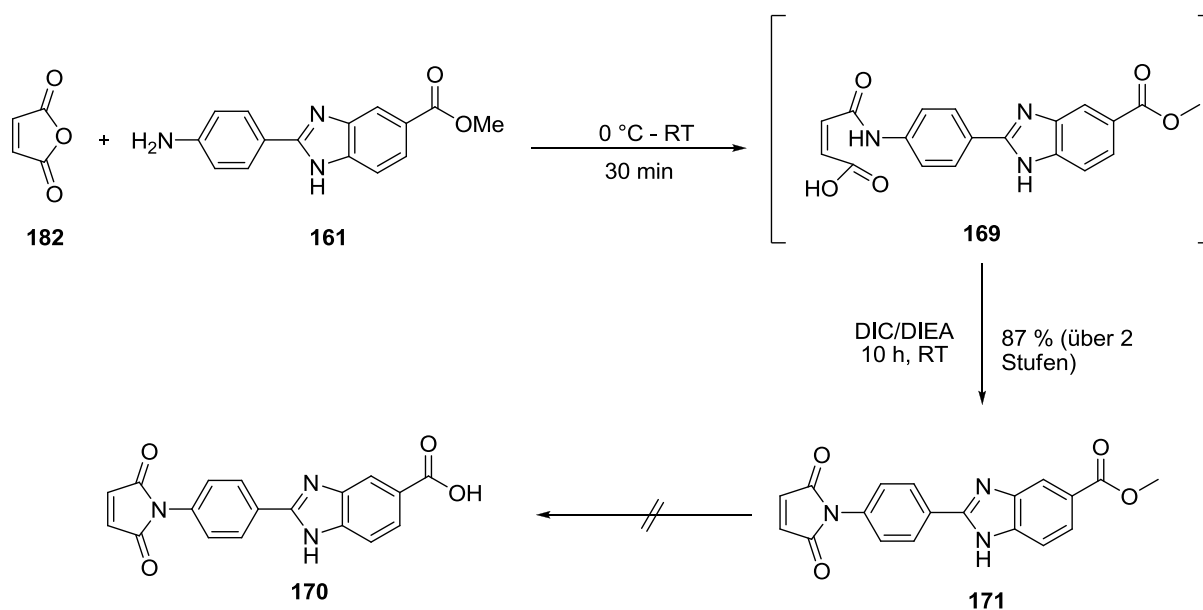


Abbildung 274: Sytheseroute 1 zur BIPM-Kopfgruppe **170** – Teil 2.

Um die kritische Benzoessäuremethylester-Spaltung zu umgehen wurde in einer weiteren Syntheseroute die komplette Reaktionssequenz umgestellt. Anstelle des Methylesters **166** wurde zur Blockierung der Carbonsäurefunktion der 3,4-Diaminobenzoessäure **183** ein Glycinmethylester-Linker, unter vorhergehender Boc-Schützung der beiden anilinischen Aminofunktionen, in einer Peptidkupplungsreaktion an das aromatische System gebunden (Abbildung 275). Die Reaktion lieferte das Pseudopeptid **184** in guten Ausbeuten. Über Testreaktionen konnte gezeigt werden, dass der Methylester des Glycin-Linkers **184** unter milden Bedingungen mit Lithiumhydroxid gespalten werden kann (Abbildung 276). Unter

identischen Bedingungen war in einer weiteren Testreaktion mit dem BIPM-Methylester **171** keine Michael-Addukt-Bildung nachzuweisen. Über den Glycin-Linker **184** sollte in einer weiteren Peptid-Kupplung das Transmembrangrundgerüst **65** an den Fluorophor gekuppelt

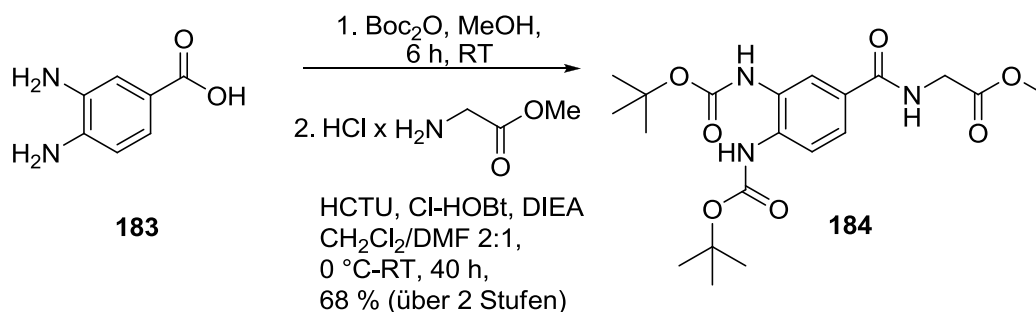


Abbildung 275: Syntheseroute 2 zur BIPM-Kopfgruppe 170 – Teil 1.

werden. An der so erhaltenen Verbindung **184** wurden die beiden Boc-Schutzgruppen in einem Gemisch aus TFA und Dichlormethan quantitativ entfernt (Abbildung 276). Das TFA-

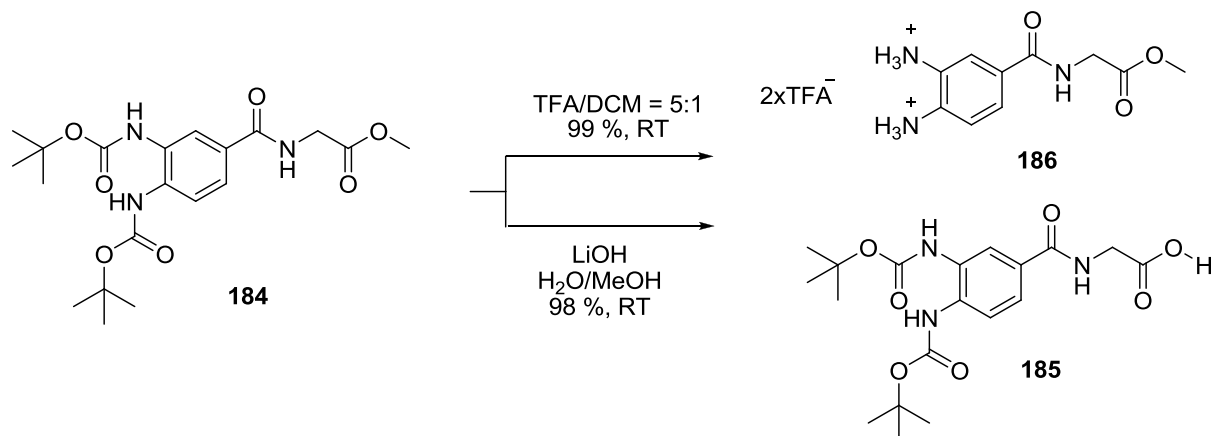


Abbildung 276: Syntheseroute 2 zur BIPM-Kopfgruppe 170 – Teil 2.

Salz **186** wurde ohne weitere Aufreinigung mit 4-Acetamidobenzoessäure **162** in Gegenwart von Trimethylsilylpolyposphat unter den bekannten Reaktionsbedingungen umgesetzt (Abbildung 277). Die Auswertung der ^1H -NMR-Spektren zeigte, dass das Glycin-Derivat **186** unter diesen Bedingungen nicht stabil ist.

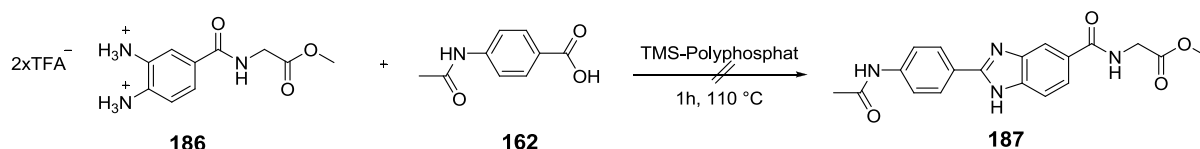


Abbildung 277: Syntheseroute 2 zur BIPM-Kopfgruppe 170 – Teil 3.

Aus zeitlichen Gründen wurde keine weitere Syntheseroute zur Synthese des Carboxy-BIPM-Fluorophors **170** mehr eingeschlagen. Im Folgenden sollten aber Experimente mit der erfolgreich synthetisierten Modellverbindung **171** durchgeführt werden, um die allgemeine Anwendbarkeit der Michael-Addition in Signaltransduktionsexperimenten zu überprüfen.

3.8.7 Experimente mit dem Carboxymethylester-BIPM-Fluorophor **171** und Ac-Cys-OH

In abschließenden Experimenten mit der Modellverbindung **171** sollte nachgewiesen werden, dass die postulierte Michael-Addition einer freien Thiofunktion an das Michael-System des BIPM-Derivat **171** zum Anschalten einer starken Fluoreszenzemission führt. Als Referenzsubstanz mit freier Thiofunktion wurde in den folgenden Messungen *N*-Ac-cystein-OH verwendet. Für die Fluoreszenzmessungen wurden Proben von *N*-Ac-cystein-OH unterschiedlicher Konzentration (10^{-5} - 10^{-4} mol/L) und einem Gesamtvolumen von 150 μ L präpariert. Die Proben wurden in Eppendorfgefäße überführt und mit 150 μ L BIPM-COOMe **171** ($c = 10^{-4}$ mol/L) versetzt. Die Proben wurden verschlossen und für 10 min bei 25 °C inkubiert und geschüttelt. Die Reaktionslösungen wurden in eine 96-Well-Platte überführt und die Emission bei 354 nm bestimmt. Abbildung 278 zeigt die Fluoreszenzspektren von BIPM-COOMe **171** in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen *N*-Ac-cystein-OH. Die Emissionsspektren zeigen, dass das Maleinimid-Derivat **171** selbst keine intrinsische Fluoreszenz

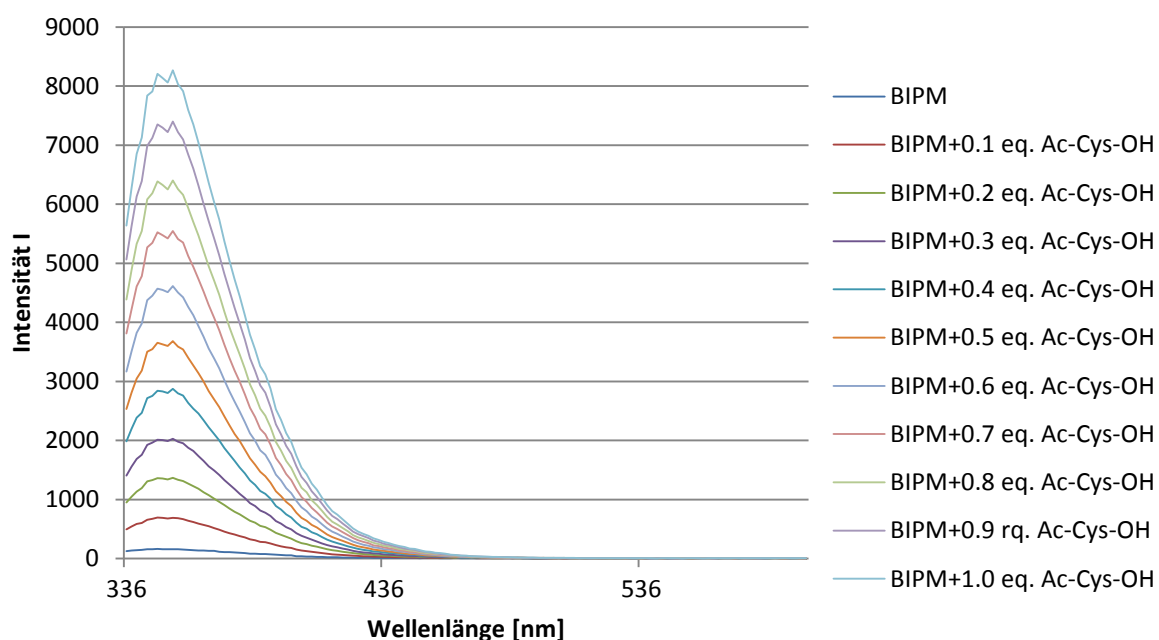


Abbildung 278: Emissionsspektren von **171** ($c = 10^{-4}$ mol/L) in Gegenwart von *N*-Ac-cystein-OH (0.1-1.0 eq.).

besitzt. Durch die Zugabe steigender Konzentrationen an freiem Thiol kann eine sukzessive Erhöhung der Fluoreszenzintensität detektiert werden. Der Anstieg folgt einem linearen Zusammenhang, so dass bei späteren Signaltransduktionsexperimenten mit entsprechend funktionalisierten Rezeptoren die Signalleitung, induziert durch Zugabe eines primären Botenstoffs, über die Liposomenmembran direkt aus dem Anstieg der Intensitäten ermittelt werden kann. Diese Detektionsmöglichkeit bietet im Vergleich zu den bisher etablierten Methoden einen klaren Vorteil bei der Beurteilung des übergeleiteten Signals.

4 Zusammenfassung

Der Prozess der Weiterleitung von Signalen ist einer der fundamentalsten Prozesse in der Natur überhaupt. Ohne die Fähigkeit, dass Zellen innerhalb eines Organismus miteinander kommunizieren können, wäre die Entstehung komplexer Lebensformen nicht möglich gewesen. Dieser defiziente Steuerungsapparat ermöglicht es erst, dass Lebewesen und deren Zellen auf äußere und innere Reize reagieren können und sich so an ihre Umwelt und Veränderungen in ihrer Umgebung anpassen können. Diesem, auch als Signaltransduktion bezeichneten Prozess, wird seit einigen Jahren große Aufmerksamkeit geschenkt. Allein die Anzahl der auf diesem Gebiet in Medizin und Chemie vergebenen Nobelpreise und die Anzahl an Veröffentlichungen, spiegeln die zentrale Bedeutung solcher Regulationsprozesse wider. Auf dem naturwissenschaftlichen Gebiet der künstlichen Signalleitung gibt es bisher nur einige wenige Beispiele, die diesen enorm wichtigen Prozess imitieren können.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten die ersten künstlichen Systeme zur Botenstoff-induzierten Signaltransduktion etabliert werden. Hierbei konnten alle drei Kriterien, die einen echten Signaltransduktionsprozess ausmachen, erfüllt werden. Die Erkennung eines primären Botenstoffs im extrazellulären Medium einer (künstlichen) Zelle, die Weiterleitung des Signals über die Doppelmembran in das Innere des abgeschlossenen Vesikels und die Antwort des Systems durch Freisetzung eines sekundären Botenstoffs in das intrazelluläre Kompartiment. Hierbei wurde das natürliche Vorbild der Rezeptortyrosinkinasen imitiert, bei dem es durch Annäherung zweier Transmembranrezeptoren, vermittelt durch Bindung eines primären Botenstoffs, zum Auslösen eines Signals im Inneren der Zelle kommt.

Das erste Ziel war die Synthese von Transmembranrezeptoren auf Basis von Lithocholsäure-Dimeren in Anlehnung an die Systeme von *Hunter* und *Maue*.^[143,174] Als Erkennungseinheiten wurden die literaturbekannten Bisphosphonatpinzetten der Arbeitsgruppe *Schrader* verwendet, die in der Lage sind, in gepufferter wässriger Lösung Amine im Mikromolaren Bereich zu binden. Auf Grundlage dieser Motive konnte ein membrandurchspannender Gerüstbaustein **65** synthetisiert werden, der nachfolgend mit verschiedenen *second messenger* Einheiten auf der intrazellulären Seite funktionalisiert werden konnte (Abbildung 279).

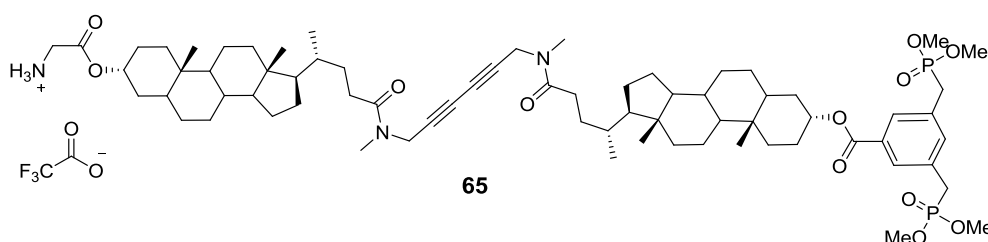


Abbildung 279: Lewissäurestruktur des transmembranen Gerüstbausteins **65** mit Bisphosphonat-Erkennungseinheit.

Als sekundäre Botenstoffe dienten verschiedene FRET-Paare (Abbildung 282), die nach Komplexierung des primären Botenstoffs im extrazellulären Medium und Verringerung des räumlichen Abstands der Rezeptoren in der Membran, die Weiterleitung des Signals in Form eines Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers detektierbar machten (Abbildung 280).

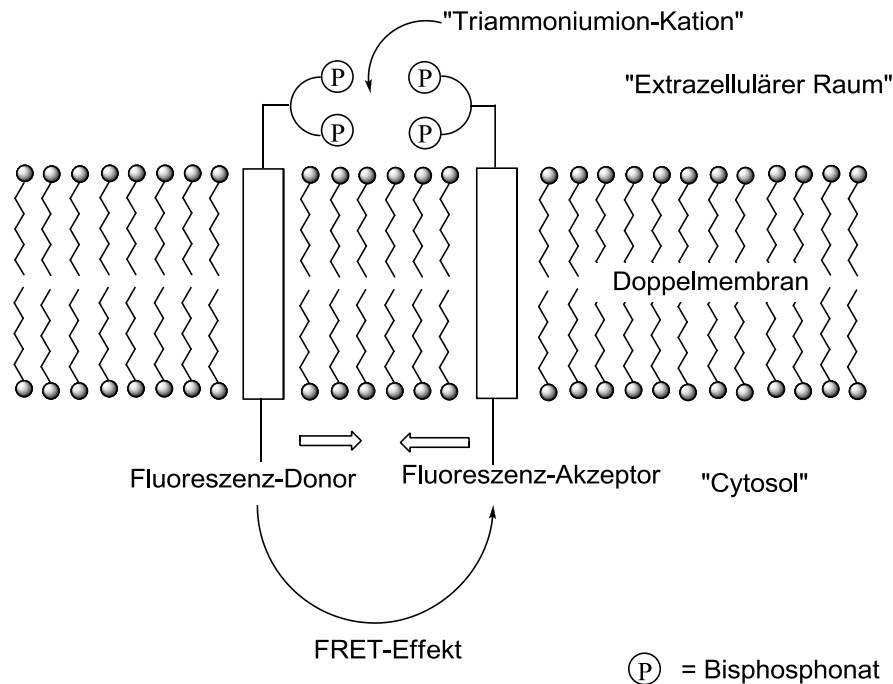


Abbildung 280: Schematische Darstellung der Amin-induzierten transmembranen Signaltransduktion.

Erste Experimente wurden mit den Transmembranrezeptoren 83 und 67 mit einer Dotierung von je 2.5 % in DPPC-Liposomen durchgeführt. Durch dieses Rezeptorsystem konnte die allgemeine Anwendbarkeit des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers als *Read out* für die Botenstoff-induzierte Signaltransduktion bestätigt werden. Weiterführende Experimente zur Optimierung der Signalleitung und detaillierte Untersuchungen, die eine unidirektionale und transmembrane Natur der Signaltransduktion nachweisen konnten, wurden mit dem optimierten Rezeptorpaar 66 und 67 und DET als primärem Botenstoff durchgeführt (Abbildung 281).

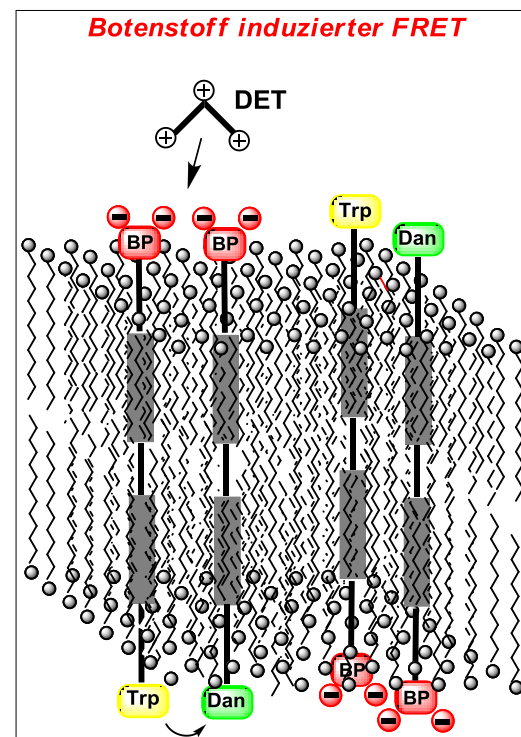


Abbildung 281: Signaltransduktion mit den Transmembranrezeptoren 66 und 67 in einer Lipiddoppelschicht

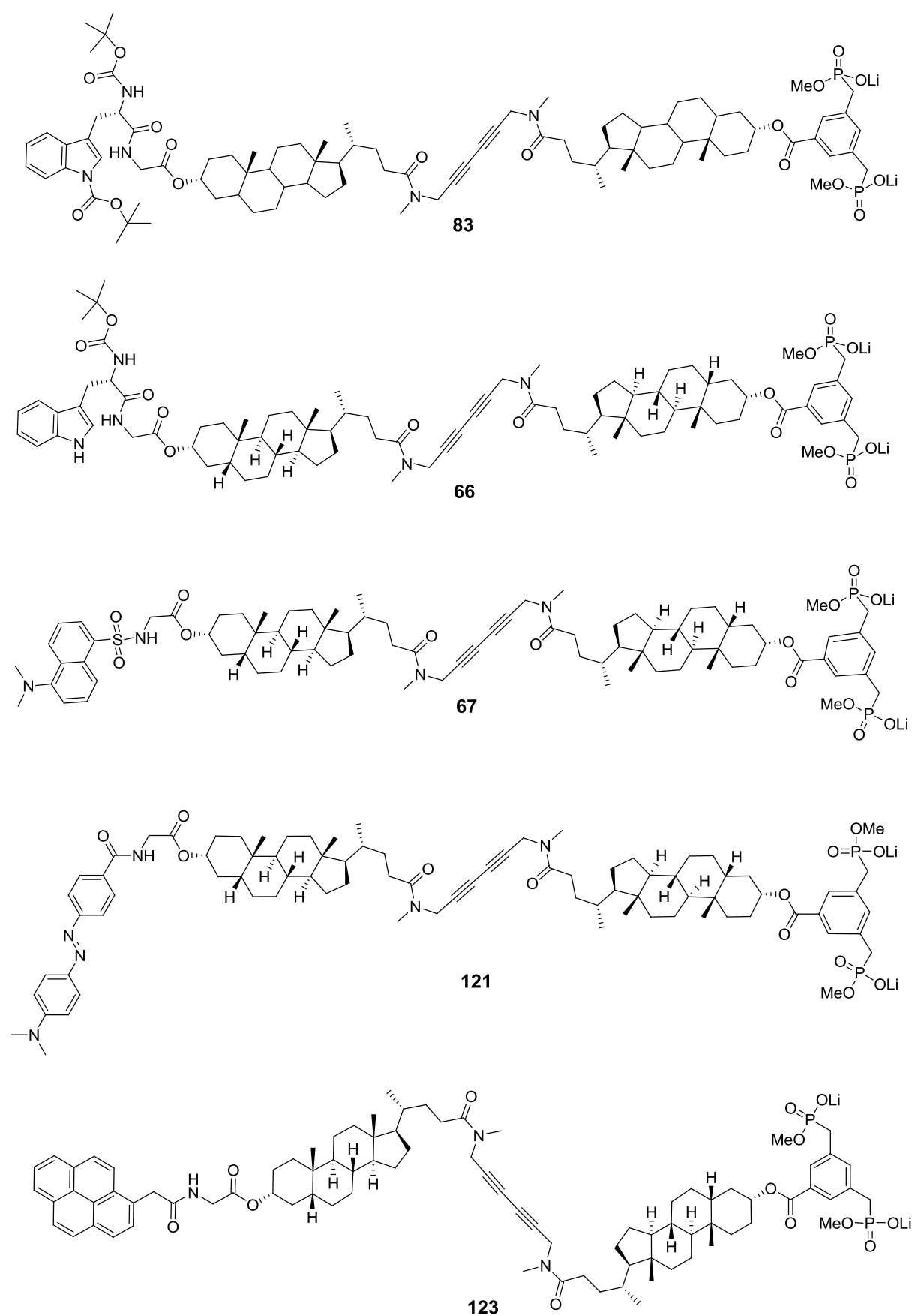


Abbildung 282: Lewissäurestrukturen der synthetisierten Transmembranrezeptoren der 1. Generation.

Durch die Verwendung von Gemischen unterschiedlicher Phosphatidylcholine (DMPC und DPPC) konnte für die Rezeptoren **66** und **67** eine optimierte Umgebung, bezüglich der Mobilität und Vororientierung, in der Membran geschaffen werden. Bei einem Mischungsverhältnis von DMPC/DPPC = 3:1 konnte für dieses System die maximale Signalleitung erreicht werden. Detaillierte Untersuchungen der Phasenübergangstemperaturen der verwendeten Lipidgemische mit Hilfe der Fluoreszenzsonde Laurdan (**24**) bestätigten, dass bei dem vorliegenden Mischungsverhältnis eine optimale Mobilität der Rezeptoren **66** und **67** in den Liposomen gewährleistet ist. Des Weiteren konnten detaillierte Informationen über den Einfluss der Rezeptoren auf die Doppelmembran der Liposomen erhalten werden.

Einer der kritischsten Punkte, der das Scheitern der transmembranen Signaltransduktion bedeutet hätte, ist in der konformativen Einlagerung der Rezeptoren auf Basis des dime- ren Lithocholsäure-Grundgerüsts **65** in Lipiddoppelschichten begründet. Das Design der Rezeptoren ist zwar durch die starre Dialkinzentraleinheit auf eine gestreckte Konformation ausgelegt, doch bietet die Pentanamid-Seitenkette der Lithocholsäure-Derivate die Möglichkeit zur freien Rotation um die vorhandenen Einfachbindungen. Neben der favorisierten, gestreckten Einlagerung der Rezeptoren **66** und **67** in die Lipiddoppelschicht (Abbildung

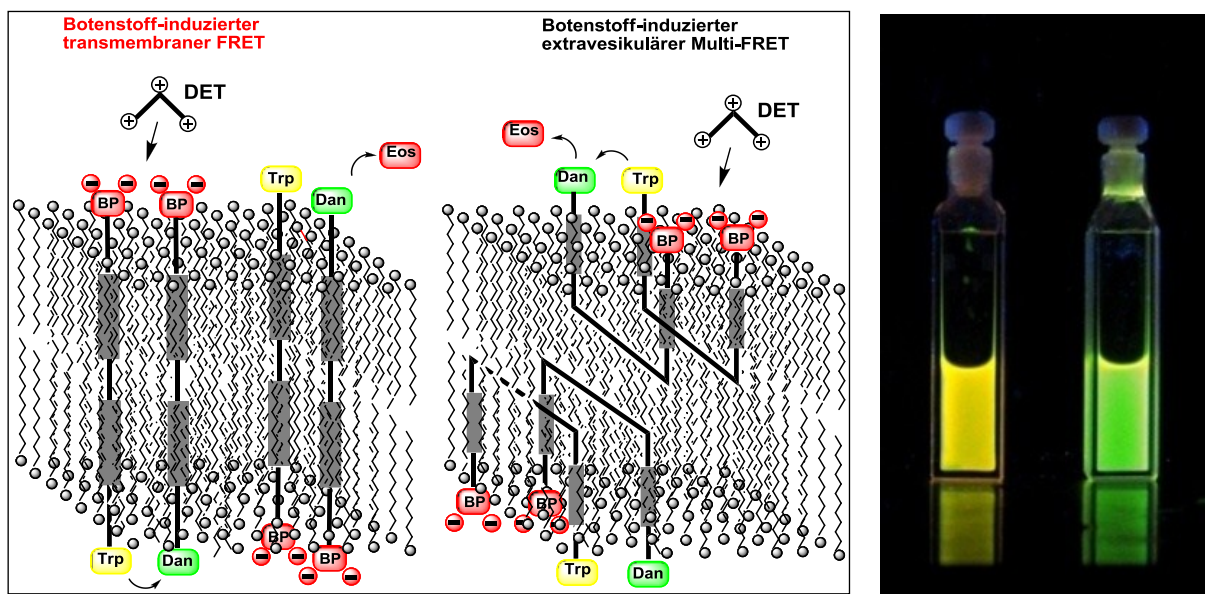


Abbildung 283: links: gestreckte Einlagerung der Rezeptoren **66** und **67**; mitte: "U-förmige" Einlagerung der Rezeptoren **66** und **67** in die Doppelmembran; rechts: Naked Eye Detection des Signaltransduktionsprozess.

283 links) ist ebenfalls eine „U-förmige“ Einlagerung der Rezeptoren **66** und **67** in nur ein Blatt der Lipiddoppelschicht denkbar (Abbildung 283 mitte). Dieser Umstand hätte bedeutet, dass die Signalleitung nur auf der Außenseite der Membran stattfindet. Die gestreckte Einlagerung der Rezeptoren **66** und **67** und die damit verbundene transmembrane Natur der Signalleitung konnte durch den Einsatz einer zusätzlichen Fluoreszenzsonde, Eosin Y **112**, im extrazellulären Medium nachgewiesen werden. Eosin Y **112** bildet mit dem Rezeptor **67** ein

weiteres FRET-Paar. Bei einer „U-förmigen“ Einlagerung der Transmembransegmente hätte es durch Zugabe des Botenstoffs DET zum Auftreten eines Multi-FRET-System kommen müssen (Abbildung 283 mitte). Im realen Experiment konnte ausschließlich die transmembrane Signalleitung, ohne Veränderung der Eosin Y-Emission, nach Zugabe des Botenstoffs DET, beobachtet werden. Als positiver Nebeneffekt dieses Experiments konnte die transmembrane Signalleitung durch einen Farbwechsel der Liposomenlösung für das bloße Auge sichtbar gemacht werden (Abbildung 283 rechts).

Der Nachweis, dass es sich bei der beobachteten Signalweiterleitung nicht nur um eine transmembrane, sondern auch um eine unidirektionale, d.h. die Erkennung des primären Botenstoffs erfolgt ausschließlich im extrazellulären Medium, Signaltransduktion handelt (Abbildung 284 links), konnte durch ein Experiment mit Liposomen erbracht werden, in die der Botenstoff DET eingeschlossen wurde (Abbildung 285). Durch Zusatz von Ninhydrin in

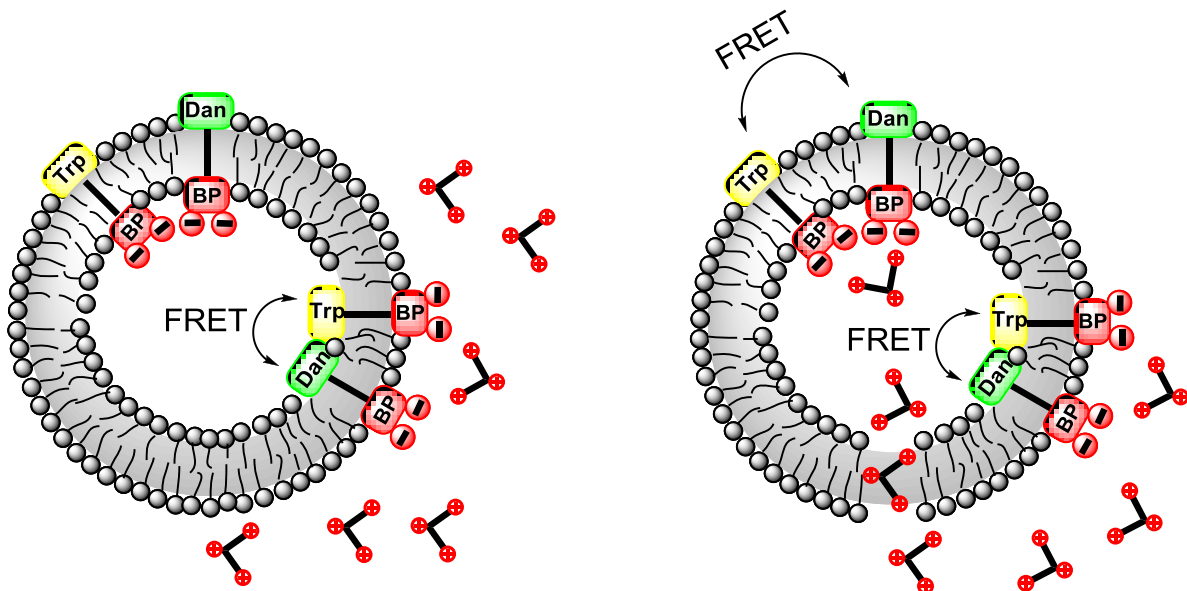


Abbildung 284: links: Unidirektionale Signalleitung bei einer für den Botenstoff nicht permeablen Membran; rechts: Ungerichtete Signaltransduktion im Fall eines membrangängigen Botenstoffs.

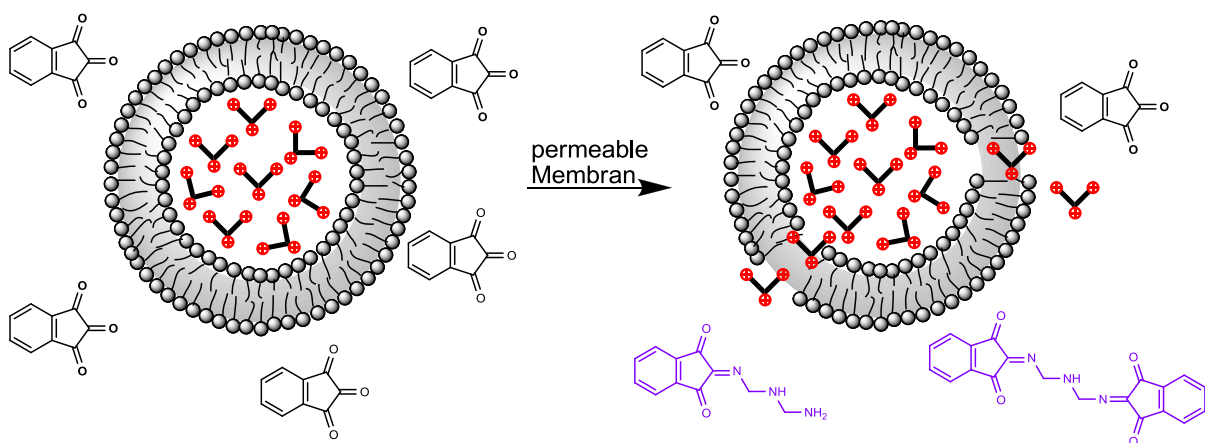


Abbildung 285: Nachweis der möglichen Membranpermeabilität von DPPC-Liposomen für den Botenstoff DET.

das extrazelluläre Medium der Botenstoff-gefüllten DPPC-Liposomen, hätte eine Permeabilität der Membran für den Botenstoff DET durch Bildung eines farbigen Komplexes sichtbar machen können (Abbildung 285). Diese hätte im Umkehrschluss bedeutet, dass auch die intrazellulären Bisphosphonatpinzetten zur Ausbildung des ternären Komplexes mit dem Botenstoff befähigt wären und die Signalleitung somit in beide Richtungen hätte stattfinden können.

Abschließend wurde noch ausgeschlossen, dass ein intervesikulärer Energie-Transfer eine erfolgreiche Signaltransduktion mit den Rezeptoren **66** und **67** vortäuscht (Abbildung 286). Durch eine chelatartige Verbrückung zweier unterschiedlicher Liposomen durch den Botenstoff DET sind theoretisch auf der Außenseite der Membran lokalisierte Fluorophore zu einem Energietransfer befähigt. Durch Separierung der Rezeptoren **66** und **67** auf zwei unterschiedliche Liposomen und anschließende Zugabe des primären Botenstoffs konnte dieser Umstand durch Detektion unveränderter Emissionsmaxima der Fluorophore ausgeschlossen werden.

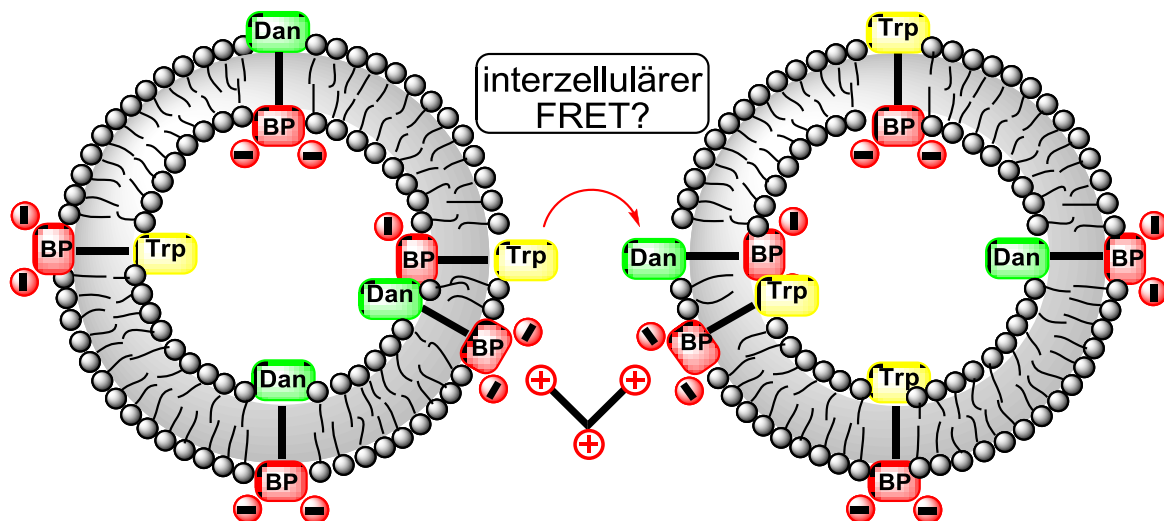


Abbildung 286: Schematische Darstellung eines möglichen interzellulären Energie-Transfers.

Durch die gesamten Ergebnisse, die mit dem Modellsystem der Rezeptoren **66** und **67** erzielt wurden, ist das hochgesteckte Ziel, ein System zur ersten künstlichen, unidirektionalen und transmembranen Signaltransduktion zu etablieren, erfolgreich bewältigt worden. Diese positiven Ergebnisse konnten in zwei weiteren, unabhängigen Systemen, bestehend aus den Rezeptoren **67** und **121** bzw. dem Rezeptor **123** belegt und reproduziert werden (Abbildung 282). Beide Systeme gründen sich ebenfalls auf dem Prinzip des Fluoreszenz-Energie-Transfers. Das System aus **67** und **121** nutzt allerdings die Löschung der Fluoreszenz-emission von **67** als Signaldetektion (Abbildung 287 links), da der Rezeptor **121** mit einem Fluoreszenz-Quencher funktionalisiert ist und das System, welches einzig aus dem Rezep-

tor **123** aufgebaut ist, die Bildung von Excimeren (angeregte Dimere) als Detektionsmethode (Abbildung 287 rechts).

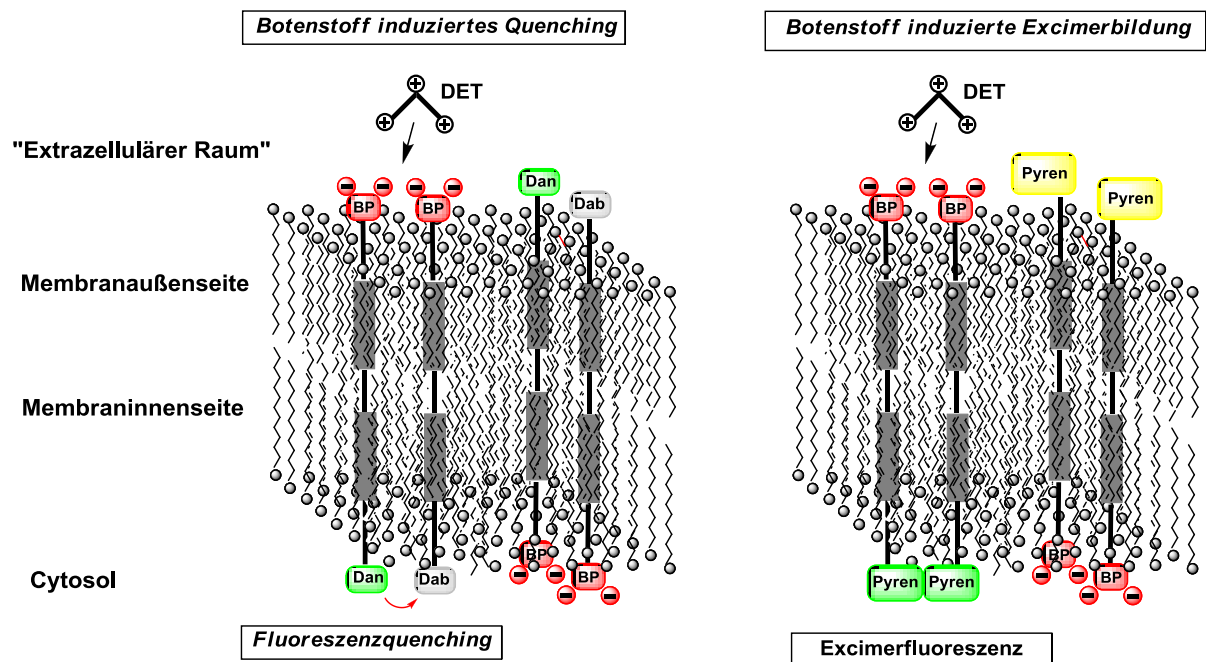


Abbildung 287: Alternative Rezeptorsysteme zur transmembranen Signalleitung; links: Donor-Quencher System mit den Rezeptoren 67 und 121; rechts: Excimer-System, aufgebaut aus dem Rezeptor 123.

Im zweiten Teil dieser Arbeit konnte die allgemeine Anwendbarkeit der zuvor beschriebenen Modellsysteme auf ein System zu echten künstlichen Signaltransduktion, unter Abspaltung eines sekundären Botenstoffs, übertragen werden (Abbildung 288). Nach dem Vorbild von *Maue* wurden im ersten Teil dieses Projekts die Rezeptoren **138** und **139** synthetisiert. [143,174]

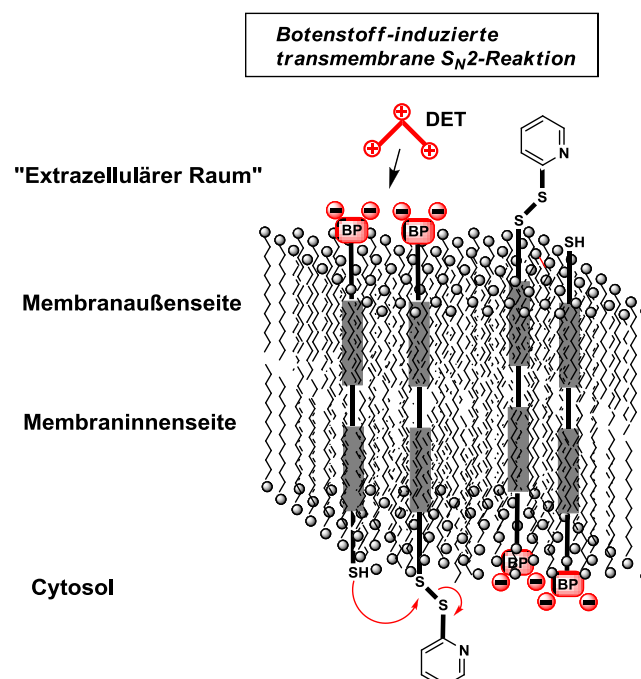


Abbildung 288: Schematische Darstellung der Signaltransduktion mit den Rezeptoren 138 und 139.

Diese Lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Analoga **138** und **139** der Transmembranrezeptoren nach Maue^[143,176] konnten, durch eine modifizierte Methode zur Liposomenpräparation unter Minimierung einer vorzeitigen Desaktivierung während der Liposomenpräparation, erfolgreich in Liposomen eingelagert werden (Abbildung 289). In dieser modifi-

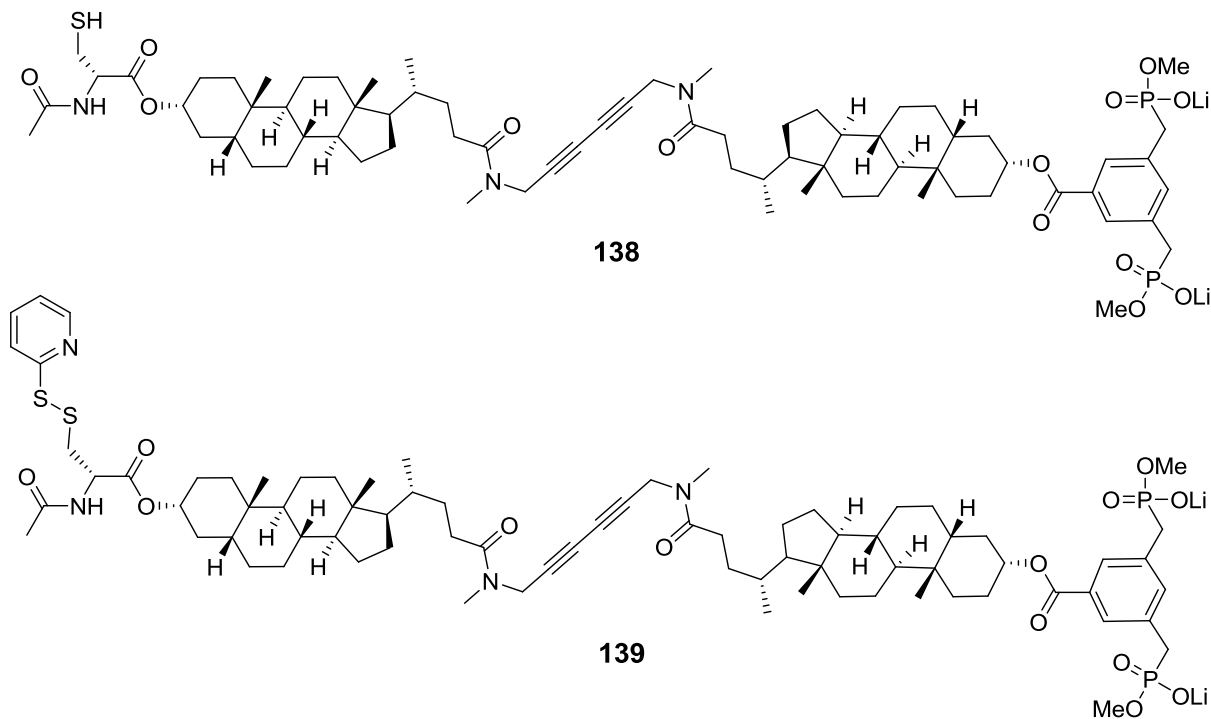


Abbildung 289: Lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Analoga **138** und **139** der Transmembranbausteine **59** und **60** nach Maue,^[143,176]

zierten Methode wurden die Bausteine **138** und **139** erst im eigentlichen Liposom vor der Extrusion vereinigt. Auch für das weiterentwickelte Rezeptorsystem **138-DET-139** konnte eine gerichtete, transmembrane Signaltransduktion durch Freisetzung des UV-aktiven sekundären Botenstoffs 2-Thiopyridin (341 nm) in das intrazelluläre Medium der Liposomen eindeutig nachgewiesen werden. Die ausschließlich extrazelluläre Erkennung des Botenstoffs DET konnte in dem vorangegangenen Experiment, unabhängig von den eingelagerten Rezeptoren, bewiesen werden. Der Nachweis, dass auch die Rezeptoren **138** und **139** in einer gestreckten Geometrie in das Liposom eingelagert sind, erfolgte über die Zugabe des Reduktionsmittels Triphenylphosphin-3,3,3-trisulfonsäure-trinatriumsalz (**146**) vor Zugabe des primären Botenstoffs DET. Durch das Reduktionsmittel **146** wurden im ersten Schritt die, durch die statistische Einlagerung der Rezeptoren **138** und **139**, auf der Außenseite der Membran befindlichen 2-Thiopyrineinheiten abgespalten. Bei einer „U-förmigen“ Einlagerung der Rezeptoren **138/139** in nur ein Blatt der Lipiddoppelschicht hätte dieser Schritt zu einer Desaktivierung des Systems führen müssen (Abbildung 290). Da auf Zugabe von DET

ein weiterer Signalanstieg durch Freisetzung von 2-Thiopyridin detektiert werden konnte, ist somit eine transmembrane Signalleitung auf direktem Wege bewiesen.

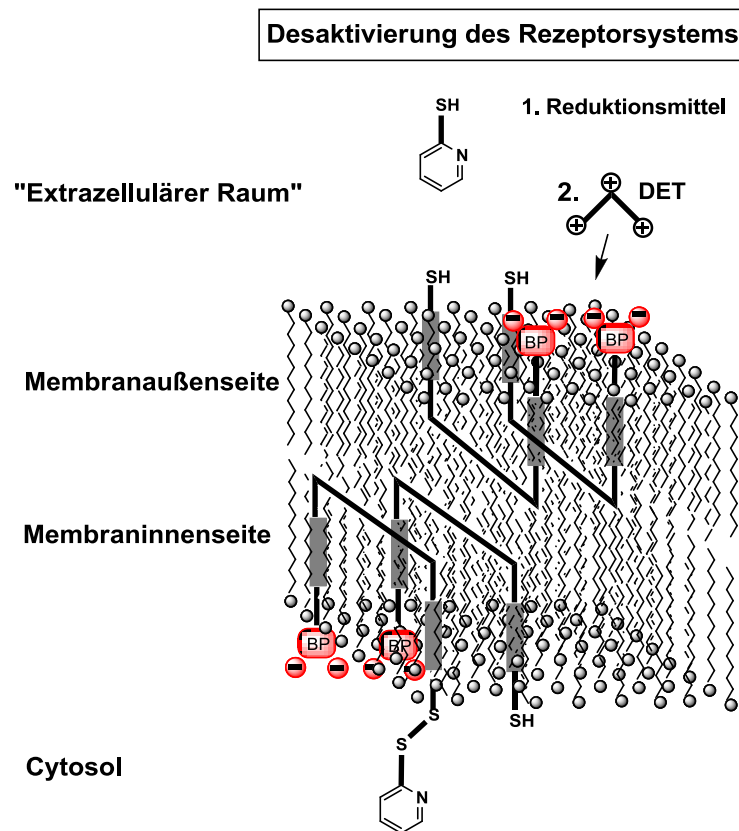


Abbildung 290: Bei "U-förmiger" Einlagerung der Rezeptoren 138 und 139 erfolgt durch Zugabe des Reduktionsmittels 146 eine Desaktivierung des Signaltransduktionssystems.

Der Ausschluss einer interzellulären Reaktion der Rezeptoren 138 und 139, aufgrund der statistischen Einlagerung in die Doppelmembran, konnte in einem analogen Experiment zu den Rezeptoren 66 und 67 erbracht werden. Die Zugabe des primären Botenstoffs DET zu einer Liposomenmischung, die jeweils nur mit einem der Rezeptoren 138/139 dotiert sind, führt zu keinem induzierten Signal (Abbildung 291).

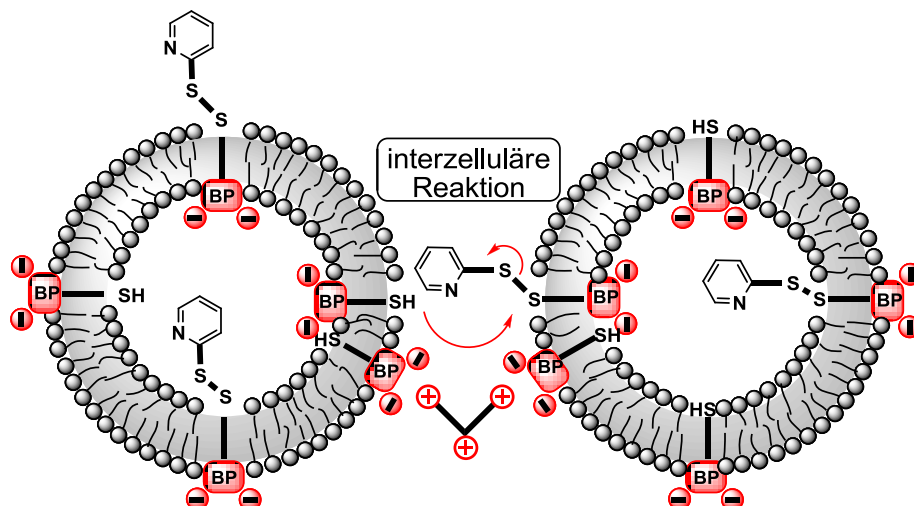


Abbildung 291: Mögliche interzelluläre Reaktion der Rezeptoren 138 und 139.

Alle vier, im Rahmen dieser Arbeit, untersuchten Rezeptorsysteme weisen eine hohe Selektivität für kleine, kompakte nicht biogene Botenstoffe auf. Neben DET (Diethylentriamin), sind auch die Oligoamine EDA (**113**) (Ethylendiamin) und TREN (**114**) (Triethylentetramin) in der Lage die Signalleitung zu induzieren. Für sämtliche getesteten natürlichen Oligoamine, wie Spermin (**116**) und Spermidin (**115**), sowie auch die biogenen Peptide Di-, Tri-, Tetraarginine (**118**), (**119**), (**120**), Tetralysin (**117**) und Adrenalin (**10**) konnte in allen Fällen kein Signal detektiert werden.

Im letzten Teil dieser Arbeit konnten Grundlagen für die Entwicklung einer neuen Generation von Transmembranrezeptoren gelegt werden. Um die Empfindlichkeit der Fluoreszenzdetektion und das eigentliche Ziel der Botenstoff-induzierten Abspaltung eines sekundären Botenstoffs in einem System vereinen zu können, wurden nach Vorarbeiten von A. Dasgupta, die in Abbildung 292 dargestellten Rezeptormotive entwickelt.

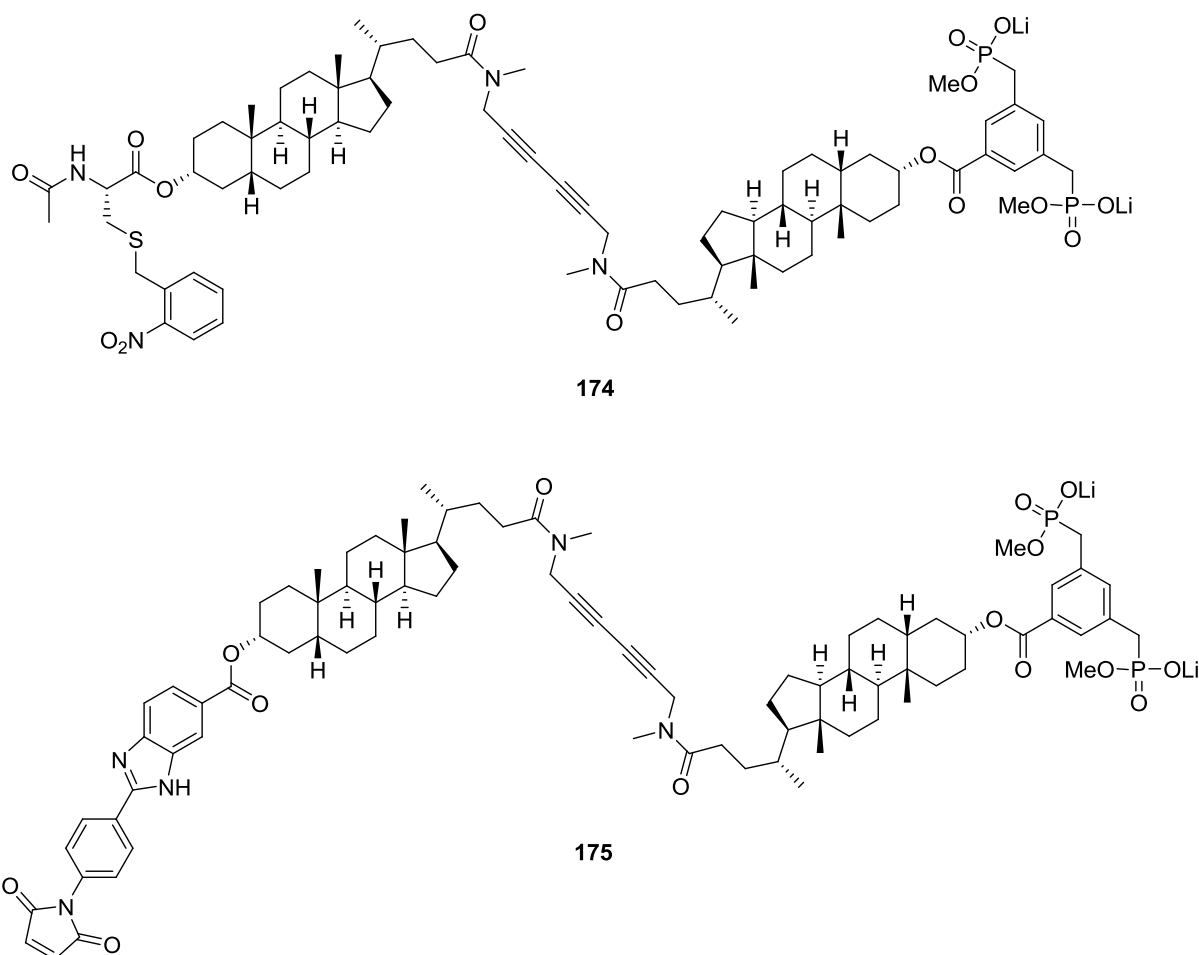


Abbildung 292: Rezeptormotive 174 und 175 einer neuen Generation von Transmembranrezeptoren.

Durch Einführung einer photolabilen Schutzgruppe am Rezeptor **174** kann eine vorzeitige Reaktion des Systems während der Liposomenpräparation vollständig unterbunden werden. Nach Freisetzung der freien Thiofunktion durch Bestrahlung mit UV-Licht kann dieser, nach Zugabe eines primären Botenstoffs, mit dem Michael-System des Rezeptors **175**,

unter Anschalten einer starken Fluoreszenz, reagieren. Die Synthese der Rezeptoren **174** und **175** konnte aufgrund synthetischer Probleme in den letzten Stufen der Synthese nicht bewerkstelligt werden.

Allerdings konnte ein Photolyse-Assay mit Hilfe der Modellverbindung **173**, nach dem Vorbild von *Smith et al.*, etabliert werden, mit dem es möglich ist, die *o*-Nitrobenzyl-Schutzgruppe unter milden Bedingungen und kurzen Bestrahlungszeiten mit einer handelsüblichen UV-Lampe im Liposom abzuspalten (Abbildung 293).^[213,255]

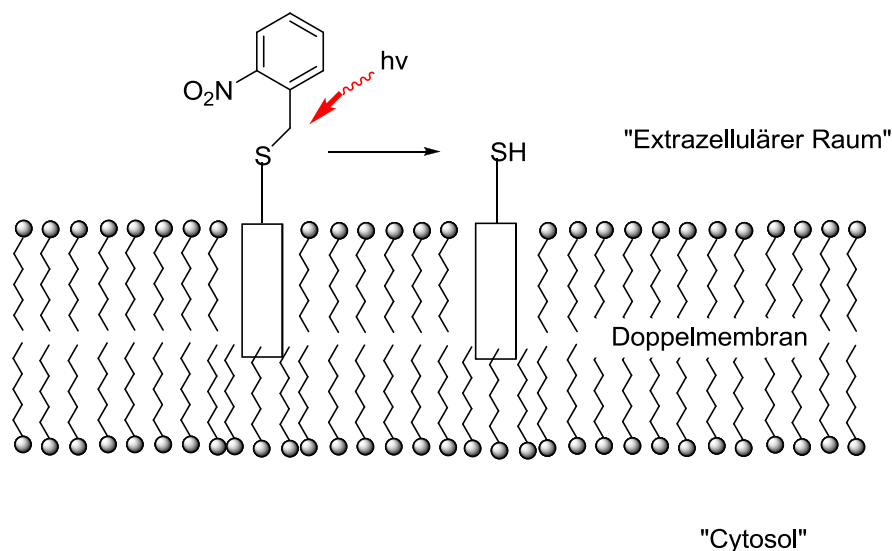


Abbildung 293: Milde Abspaltung der *o*-Nitrobenzyl-Photoschutzgruppe **173** im Liposom.

Zudem konnte eine effiziente Synthese der BIPM-Kopfgruppe der Rezeptors **175** entwickelt und im Grammmaßstab etabliert werden. Durch Untersuchungen der Modellverbindung **171** konnte gezeigt werden, dass die gleichzeitige Anwesenheit von freien Thiolfunktion zu einer starken Fluoreszenzaktivierung führt und in Kombination mit der Photoschutzgruppe **173** ein für Folgearbeiten auf diesem Gebiet, vielversprechendes neues Rezeptorsystem darstellt (Abbildung 294).

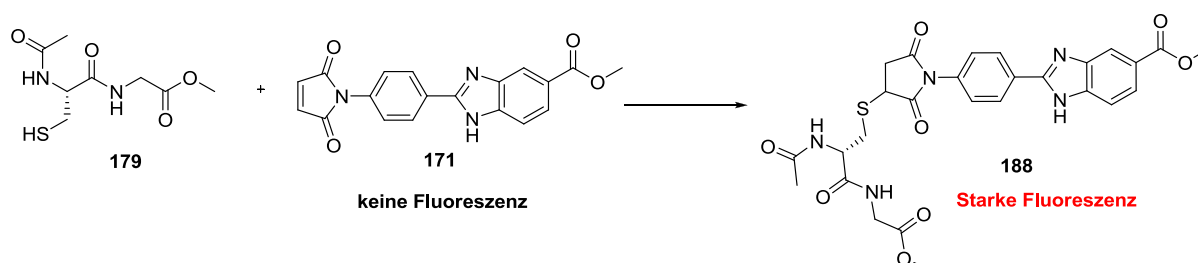


Abbildung 294: Fluoreszenzaktivierung der Rezeptorkopfgruppe **171**.

5 Experimenteller Teil

5.1 Materialien

▪ Chemikalien

Die in der Synthese eingesetzten Chemikalien wurden über die Firmen *Aldrich Chemical Co.* (Taufkirchen), *Bachem* (Bubendorf/Schweiz), *Fluka* (Taufkirchen), *Acros Organics* (Geel/Belgien), *Lancaster Synthesis* (Frankfurt/Main) und *Novabiochem* (Schwalbach) in den Qualitäten *purris.*, *purrum* oder *p.a.* erworben.

Die zur Liposomenpräparation verwendeten Phosphatidylcholine *1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin* (DPPC) und *1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin* (DMPC) wurden über *Avanti Polar Lipids, Inc.* (Alabaster) bezogen.

▪ Lösungsmittel

Die verwendeten Lösungsmittel wurden über die Firmen *Fluka* (Taufkirchen) und *Aldrich Chemical Co.* (Taufkirchen) in der Qualität *purris.* und *anhydrous* erworben und über Molsieb gelagert oder vor Gebrauch destilliert und bei Bedarf nach Standardmethoden absolutiert.^[258]

Die für die NMR-Spektroskopie verwendeten deuterierten Lösungsmittel wurden über die Firma *Aldrich Chemical Co.* bezogen und über Molsieb gelagert.

Das eingesetzte Wasser war entionisiert und wurde im Bedarfsfall nochmals über eine *ELGA Purelab UHQ* Anlage entionisiert.

▪ Chromatographie

Bei der Dünnschichtchromatographie kamen *Alugram SIL G/UV₂₅₄* bzw. *Polygram SIL G/UV₂₅₄* Kieselgelplatten mit Fluoreszenzindikator der Firma *Roth* (Karlsruhe) zum Einsatz. Zur Detektion wurde UV-Licht der Wellenlängen $\lambda = 254 \text{ nm}$ und 366 nm verwendet. Alternativ wurden die Dünnschichtchromatogramme mit CAM- bzw. Molybdato-phosphorsäure-Reagenz angefärbt und anschließend im Heißluftstrom entwickelt.

CAM-Reagenz: 2 g Cersulfat, 50 g Ammoniummolybdat und 50 mL konz. H_2SO_4 in 400 mL dest. Wasser.

Molybdatophosphorsäure-Reagenz: 10%ige-Molybdatophosphorsäure-Lösung in Ethanol

Die präparative Säulenchromatographie wurde an Kieselgel 60 der Firma *Fluka* (Taufkirchen) durchgeführt. Die verwendeten Laufmittelgemische und die erhaltenen R_f -Werte sind im Syntheseteil 5.3 bei den entsprechenden Synthesevorschriften vermerkt.

▪ **Verwendete Puffer**

MES-Puffer: Für die Liposomenexperimente wurde MES-Puffer (2-[*N*-Morpholino]ethansulfonsäure) verwendet. Dieser wurde über *Sigma-Aldrich Chemie GmbH* (Steinheim) als Standard-Pack bezogen. Ein Paket, gelöst in 100 mL entionisiertem Wasser ergibt einen 1 M Natrium-MES-Puffer ($\text{pH} = 6.1$ bei 25°C). Dieser Standard-Puffer wurde mit entionisiertem Wasser verdünnt und mit 1 M Salzsäure auf $\text{pH} = 5.5$ (25°C) eingestellt, so dass sich eine resultierende Konzentration $c(\text{MES}) = 375 \text{ mmol}$ ergibt. Eine Pufferlösung derselben Konzentration wurde mit 1 M Natronlauge auf $\text{pH} = 7.0$ eingestellt.

PBS-Puffer: Für die Experimente zur Bestimmung freier Thiolgruppen wurde PBS-Puffer (*Phosphate buffered saline*) verwendet. Dieser wurde über *Sigma-Aldrich Chemie GmbH* (Steinheim) als Standard-Pack bezogen. Eine Tablette gelöst in 200 mL entionisiertem Wasser ergibt eine resultierende Ionenkonzentration von 0.137 M NaCl, 0.0027 M KCl, 0.01 M Phosphat ($\text{pH} = 7.4$ bei 25°C). Die resultierende Pufferlösung wurde anschließend mit 2 M Salzsäure auf $\text{pH} = 7.0$ eingestellt.

Photolysepuffer 1: Für die Photolyseexperimente wurde folgender Photolysepuffer (50 mM Semicarbazid hydrochlorid, 20 mM L(-)-Ascorbinsäure in Acetonitril : PBS-Puffer (0.05 M) = 1:1, $\text{pH} = 7.2$) verwendet.^[213] Zur Herstellung eines 0.05 M PBS-Puffers wurden 5 Standard-Tabletten in 100 mL entionisiertem Wasser gelöst und anschließend auf 200 mL aufgefüllt. 0.558 g Semicarbazid hydrochlorid (5.0 mmol) und 0.353 g L(-)-Ascorbinsäure (2.0 mmol) wurden in 50 mL Acetonitril gelöst und anschließend mit 0.5 M PBS-Puffer auf 100 mL aufgefüllt. Der erhaltene Photolysepuffer (0.3425 M NaCl, 0.00675 M KCl, 0.025 M Phosphat, 0.05 M Semicarbazid, 0.02 M L(-)-Ascorbinsäure, $\text{pH} = 3.75$) wurde mit 1 M Natronlauge auf $\text{pH} = 6.0$ eingestellt, entgast

und unter Argonatmosphäre im Kühlschrank aufbewahrt. Der Puffer ist unter diesen Bedingungen mehrere Tage haltbar.

Photolysepuffer 2: Für die Photolyseexperimente wurde des Weiteren folgender Photolysepuffer (50 mM Semicarbazid hydrochlorid, 20 mM L(-)-Ascorbinsäure in Acetonitril : PBS-Puffer (0.01 M) = 1:1, pH = 6.0) verwendet. Zur Herstellung eines 0.01 M PBS-Puffers wurde eine Standard-Tablette in 100 mL entionisiertem Wasser gelöst und anschließend auf 200 mL aufgefüllt. 0.558 g Semicarbazid hydrochlorid (5.0 mmol) und 0.353 g L(-)-Ascorbinsäure (2.0 mmol) wurden in 50 mL Acetonitril gelöst und anschließend mit 0.1 M PBS-Puffer auf 100 mL aufgefüllt. Der erhaltene Photolysepuffer (0.137 M NaCl, 0.0027 M KCl, 0.01 M Phosphat, 0.05 M Semicarbazid, 0.02 M L(-)-Ascorbinsäure, pH = 4.4) wurde mit 1 M Natronlauge auf pH = 6.0 eingestellt, entgast und unter Argonatmosphäre im Kühlschrank aufbewahrt. Der Puffer ist unter diesen Bedingungen mehrere Tage haltbar.

Photolysepuffer 3: 0.5 mM Semicarbazid hydrochlorid, 0.2 mM L(-)-Ascorbinsäure in PBS-Puffer (0.01 M), pH = 6.0. Zur Herstellung eines 0.01 M PBS-Puffers wurde eine Standard-Tablette in 100 mL entionisiertem Wasser gelöst und anschließend auf 200 mL aufgefüllt. 0.00558 g Semicarbazid hydrochlorid (0.05 mmol) und 0.00353 g L(-)-Ascorbinsäure (0.02 mmol) wurden anschließend in 100 mL 0.01 M PBS-Puffer gelöst. Der erhaltene Photolysepuffer (0.137 M NaCl, 0.0027 M KCl, 0.01 M Phosphat, 0.5 mM Semicarbazid, 0.2 mM L(-)-Ascorbinsäure, pH = 4.4) wurde mit 1 M Natronlauge auf pH = 6.0 eingestellt, entgast und unter Argonatmosphäre im Kühlschrank aufbewahrt. Der Puffer ist unter diesen Bedingungen mehrere Tage haltbar.

Photolysepuffer 4: 50 mM Semicarbazid hydrochlorid, 20 mM L(-)-Ascorbinsäure in Acetonitril : MES-Puffer (0.375 M) =1:1, pH = 5.5. 0.558 g Semicarbazid hydrochlorid (5.0 mmol) und 0.353 g L(-)-Ascorbinsäure (2.0 mmol) wurden in 50 mL Acetonitril gelöst und anschließend mit 0.375 M PBS-Puffer auf 100 mL aufgefüllt. Der erhaltene Photolysepuffer (0.375 M 2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure, 0.05 M Semicarbazid, 0.02 M L(-)-Ascorbinsäure, pH = 6.1) wurde mit 2 M Salzsäure auf pH = 5.5 eingestellt, entgast und unter Argonatmosphäre im Kühlschrank aufbewahrt. Der Puffer ist unter diesen Bedingungen mehrere Tage haltbar.

Photolysepuffer 5: 20 mM L(-)-Ascorbinsäure in Acetonitril : MES-Puffer (0.375 M) =1:1, pH = 5.5. 0.353 g L(-)-Ascorbinsäure (2.0 mmol) wurden in 50 mL Acetonitril gelöst und anschließend mit 0.375 M PBS-Puffer auf 100 mL aufgefüllt. Der erhaltene Photolysepuffer (0.375 M 2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure, 0.02 M L(-)-Ascorbinsäure, pH = 6.1) wurde mit 2 M Salzsäure auf pH = 5.5 eingestellt, entgast und unter Argonatmosphäre im Kühlschrank aufbewahrt. Der Puffer ist unter diesen Bedingungen mehrere Tage haltbar.

5.2 Methoden

▪ Kernresonanz-Spektroskopie

Die Kernresonanzspektren wurden mit folgenden Geräten gemessen:

Bruker Advance DRX-500 (^1H , ^{13}C , ^{31}P , DEPT 90, DEPT 135, gs-COSY 90, gs-HMQC, gs-HMBC, gs-NOESY (TPPI 5mm TBI-Kopf))

Bruker Advance DMX-300 (^1H , ^{13}C , ^{31}P , DEPT 135, DEPT 90)

In den ^1H -NMR-Spektren beziehen sich die angegebenen chemischen Verschiebungen δ auf das Restprotonensignal des verwendeten deuterierten Lösungsmittels. In den ^{13}C -NMR-Spektren wurde auf das ^{13}C -Signal des verwendeten Lösungsmittels kalibriert. Die Angabe der chemischen Verschiebung δ erfolgt in parts per million (ppm). Die eingesetzten deuterierten Lösungsmittel sind in den jeweiligen Spektren vermerkt. Alle ^{13}C -NMR-Spektren wurden Breitband-entkoppelt gemessen.

Die Kopplungskonstanten J sind in Hertz (Hz) angegeben. Die Beschreibung der Spinmultiplizitäten erfolgt folgendermaßen: s = Singulett, d = Dublett, dd = Dublett vom Dublett, ddd = Dublett vom Dublett vom Dublett, m = Multiplett, t = Triplet, dt = Dublett vom Triplet, q = Quartett, qt = Quintett, bs = breites Singulett. Zusätzlich zur Multiplizität ist die integrierte Protonenzahl angegeben. Die genauere Zuordnung der Signale wurde mit Hilfe von 2D-NMR-Experimenten vorgenommen. Die Erläuterung erfolgt anhand eines kurzen Formalabschnitts.

▪ Massenspektroskopie

Die Massenspektren, inklusive der hochaufgelösten Massenspektren, wurden auf einem Bruker Bio TOF III gemessen. Die Messmethode wird im jeweiligen Analytikteil neben dem Lösungsmittel in Klammern angegeben. Angegeben sind des Weiteren jeweils die m/z -Werte der wichtigsten Signale. Zusätzlich sind die Summenformel, die berechnete Masse und die gemessene Masse angegeben.

▪ IR-Spektroskopie

Die IR-Spektren wurden an einem *Varian 3100* FT-IR-Spektrometer der *Excalibur* Serie mittels *ATR*-Methode gemessen (*attenuated total reflection* = abgeschwächte Totalreflexion) gemessen. Die Angabe der Schwingungsbanden erfolgt in reziproken Zentimetern [cm^{-1}]. Die Beschreibung der Schwingungsbanden erfolgt folgendermaßen: s = stark, m = mittel, w = schwach, b = breit.

▪ UV-Vis-Spektroskopie

Für die Messungen der UV-Vis-Spektren wurden folgende Geräte verwendet:

1. FP-6500-Spektrometer der Firma *Jasco*
2. Tecan infinite M 200 Microplatereader der Firma *Tecan*

▪ Fluoreszenz-Spektroskopie

Für die Fluoreszenzmessungen der Signaltransduktionsexperimente und der Übersichtsspektren wurde der Tecan infinite M 200 Microplatereader der Firma *Tecan* verwendet.

Die temperaturabhängigen Messungen und die Messungen mit der Fluoreszenzsonde Laurdan erfolgten mit dem FP-6500-Spektrometer der Firma *Jasco*.

▪ Schmelzpunkte

Die Schmelzpunkte wurden mit einer Electrothermal BI-9100-Apparatur der Firma *Bornstead* gemessen und sind nicht korrigiert.

- **Probenvorbereitung**

Für die Gefriertrocknung der Liposomenfilme und wasserhaltiger Proben wurde die Gefriertrocknungseinheit Alpha 2-4 LSC der Firma *Christ* verwendet.

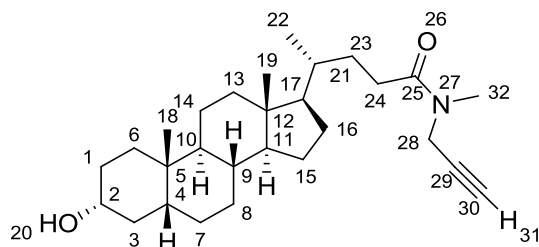
- **Liposomenpräparation**

Für die hergestellten Lösungen wurden ausschließlich hochreine Lösungsmittel verwendet. Zur Herstellung unilamellarer Liposomen nach der Extrusionmethode wurde das LiposoFast Basic System mit Stabilisator von *Avestin* mit 200 nm Polycarbonatmembranen verwendet.

5.3 Synthesen

5.3.1 Synthese der transmembranen Gerüstbausteine

5.3.1.1 Lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid (71)



Ansatz:

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
Lithocholsäure (63)	376.58	1.0	3.320	1.25	
<i>N</i> -Methylpropargylamin (70)	69.11	1.5	4.979	0.344	0.415
DCC	206.33	1.2	3.983	0.822	
4-DMAP	122.17	0.2	0.664	0.081	
CH ₂ Cl ₂					30.0

Durchführung:

1.25 g Lithocholsäure (**63**) (3.32 mmol, 1 eq.), 0.415 mL *N*-Methylpropargylamin (**70**) (0.344 g, 4.979 mmol, 1.5 eq.) und 0.081 g 4-DMAP (0.664 mmol, 0.2 eq.) wurden in 20 mL Dichlormethan gelöst. Unter Rühren wurde eine Lösung von 0.822 g DCC (3.983 mmol, 1.2 eq.) in Dichlormethan langsam zugetropft. Die Zugabe war nach 2 h beendet. Die Reaktionslösung wurde weitere 15 h bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsfortgang wurde mittels DC überprüft. Das bei der Reaktion entstandene DCU wurde über eine mit Celite beschickte Fritte abgetrennt, der Rückstand gründlich mit Dichlormethan gewaschen und die organischen Phasen vereinigt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der ölige, farblose Feststoff (2.5 g) im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wurde anschließend säulenchromatographisch gereinigt (*n*-Hexan : Ethylacetat = 2:1) und das Produkt im Ölpumpenvakuum getrocknet. Es konnten 1.15 g (2.689 mmol) eines farblosen, feinkristallinen Feststoffs isoliert werden.

Analytik:

Ausbeute: 81 %. **R_F:** 0.17 (*n*-Hexan : Ethylacetat = 2:1). **Schmp.:** 98 °C. **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ = 0.61 (s, 3H, H-19), 0.88 (s, 3H, H-18), 0.89 (d, ³*J*_{HH} = 6.46 Hz, 3H, H-22), 0.92-0.99 (m, 1H, H-6), 1.01-1.23 (m, 8H, H-7, H-8, H-11, H-13, H-14, H-15, H-16, H-17), 1.25-1.43 (m, 8H, H-1, H-4, H-8, H-9, H-10, H-14, H-23), 1.45-1.49 (m, 1H, H-3), 1.51-1.55 (m, 1H, H-15), 1.60-1.63 (m, 1H, H-1), 1.69-1.87 (m, 5H, H-3, H-6, H-7, H-16, H-21), 1.90-1.93 (m, 1H, H-13), 2.03 (bs, 1H, H-20), 2.17 (t, ⁴*J*_{HH} = 2.49 Hz, 0.7H, H-31), 2.15-2.27 (m, 1H, H-24), 2.28 (t, ⁴*J*_{HH} = 2.49 Hz, 0.3H, H-31), 2.30-2.42 (m, 1H, H-24), 2.95 (s, 1H, H-32), 3.04 (s, 2H, H-32), 3.55-3.61 (m, 1H, H-2), 4.01 (s, 0.6H, H-28), 4.19 (s, 1.4H, H-28). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, CDCl₃): δ = 12.1 (C19), 18.6 (C22), 20.9 (C14), 23.4 (C18), 24.3 (C15), 26.5 (C8), 27.3 (C7), 28.3 (C16), 30.2 (C24), 30.4 (C1), 30.6 (C24), 31.0 (C23), 31.3 (C23), 33.4 (C32), 34.4 (C32), 34.5 (C6), 35.6 (C21), 35.6 (C5), 35.9 (C9), 36.2 (C28), 36.5 (C3), 39.6 (C28), 40.2 (C13), 40.5 (C10), 42.2 (C4), 42.8 (C12), 56.1 (C17), 56.5 (C11), 71.7 (C30), 71.8 (C2), 71.8 (C30), 78.3 (C29), 79.0 (C29), 173.4 (C25). **IR** (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3410 (w), 3269 (w), 2928 (s), 2858 (m), 2161 (w), 1980 (w), 1645 (s), 1467 (w), 1412 (w), 1296 (m), 1070 (m), 1041 (s). **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für C₂₈H₄₅NO₂Na: *m/z* 450.3343, gef.: *m/z* 450.3351.

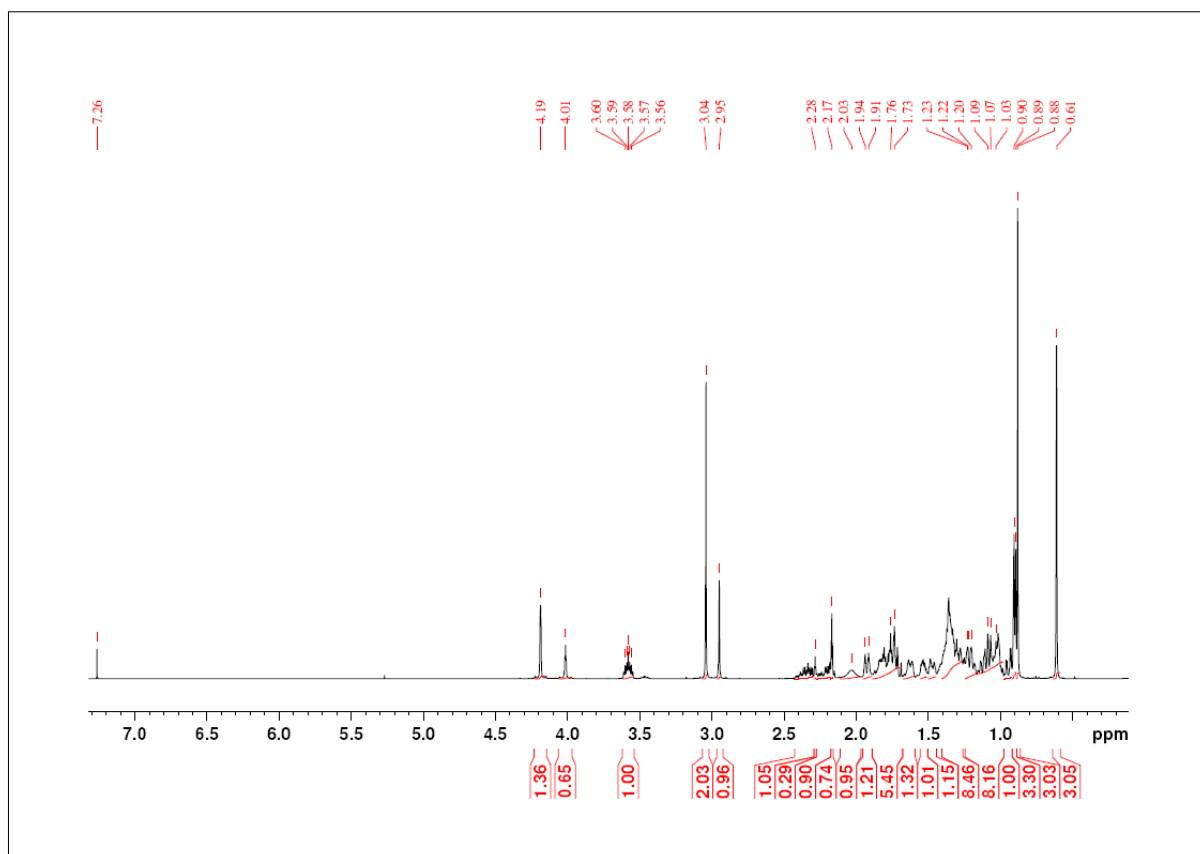


Abbildung 295: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): Lithocholsäure-N-methylpropargylamid (71).

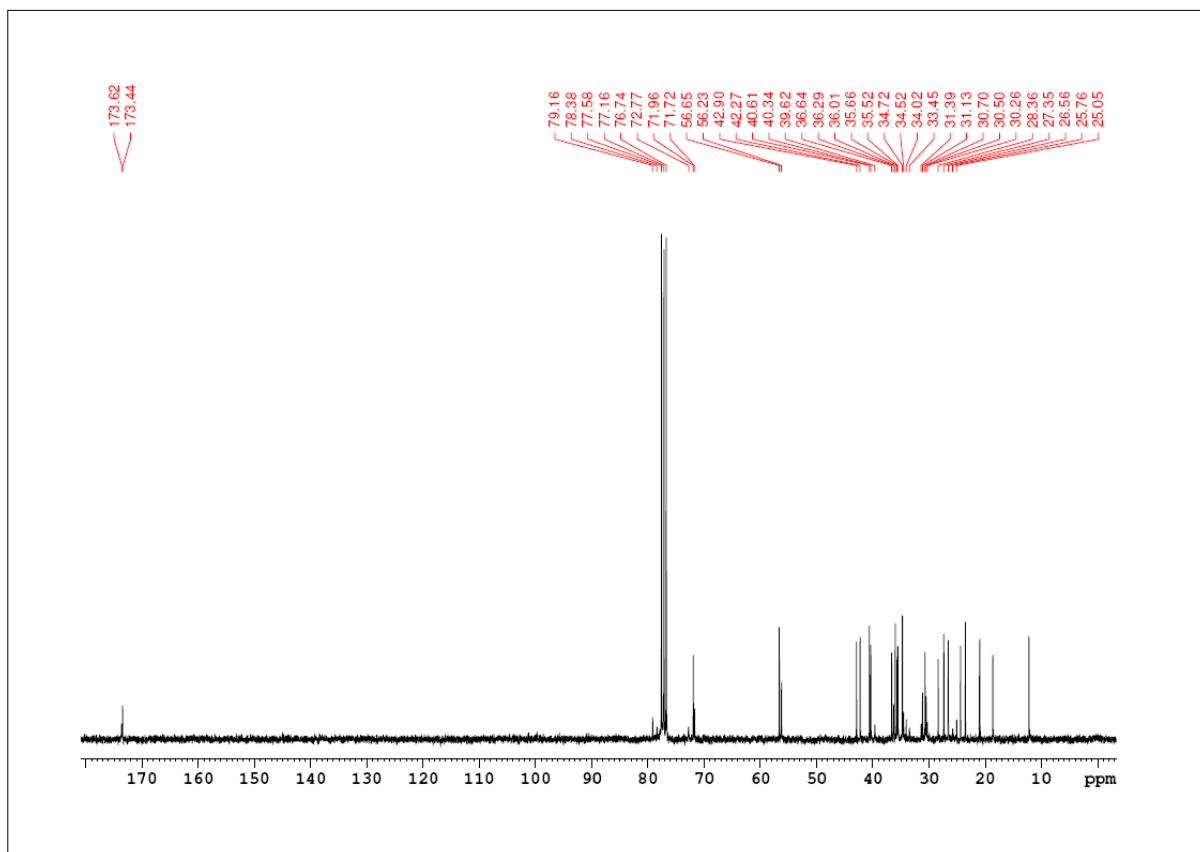


Abbildung 296: ¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃): Lithocholsäure-N-methylpropargylamid (71).

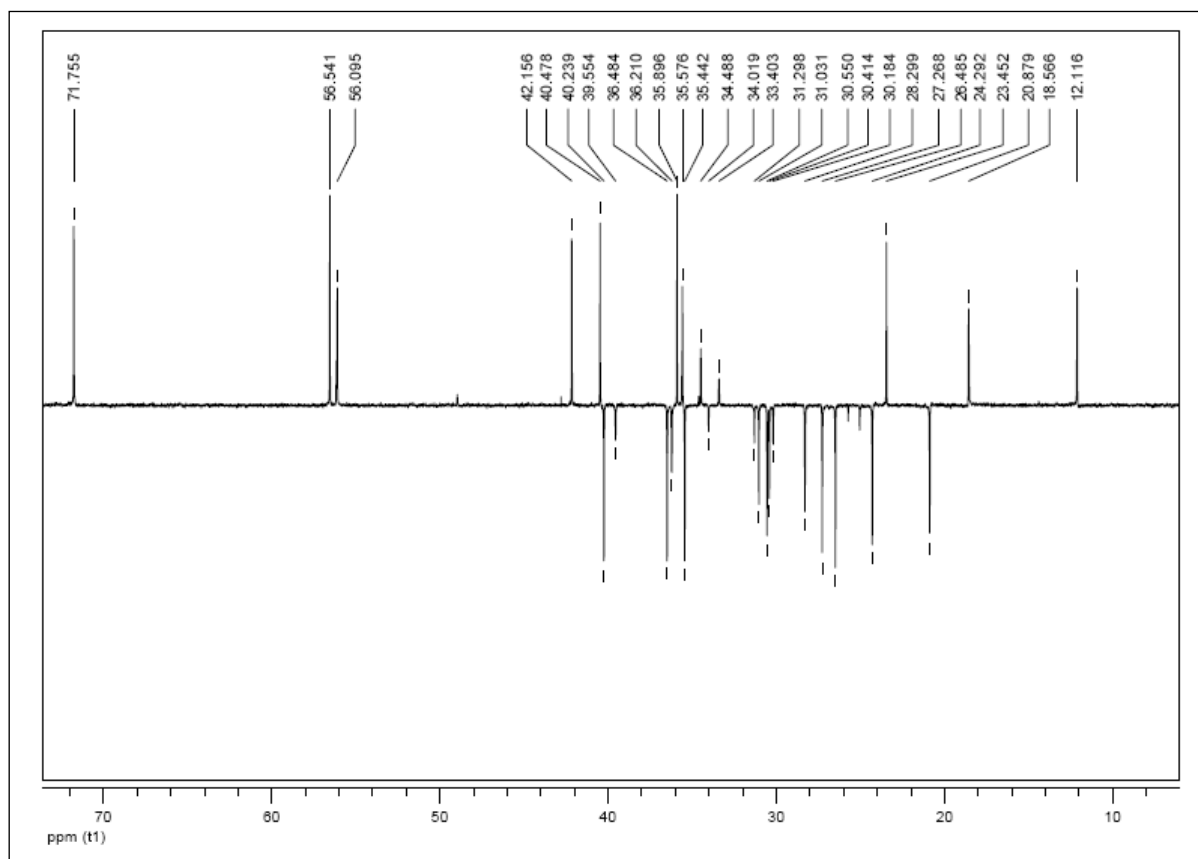


Abbildung 297: DEPT-135-NMR (125.7 MHz, CDCl_3): Lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid (71).

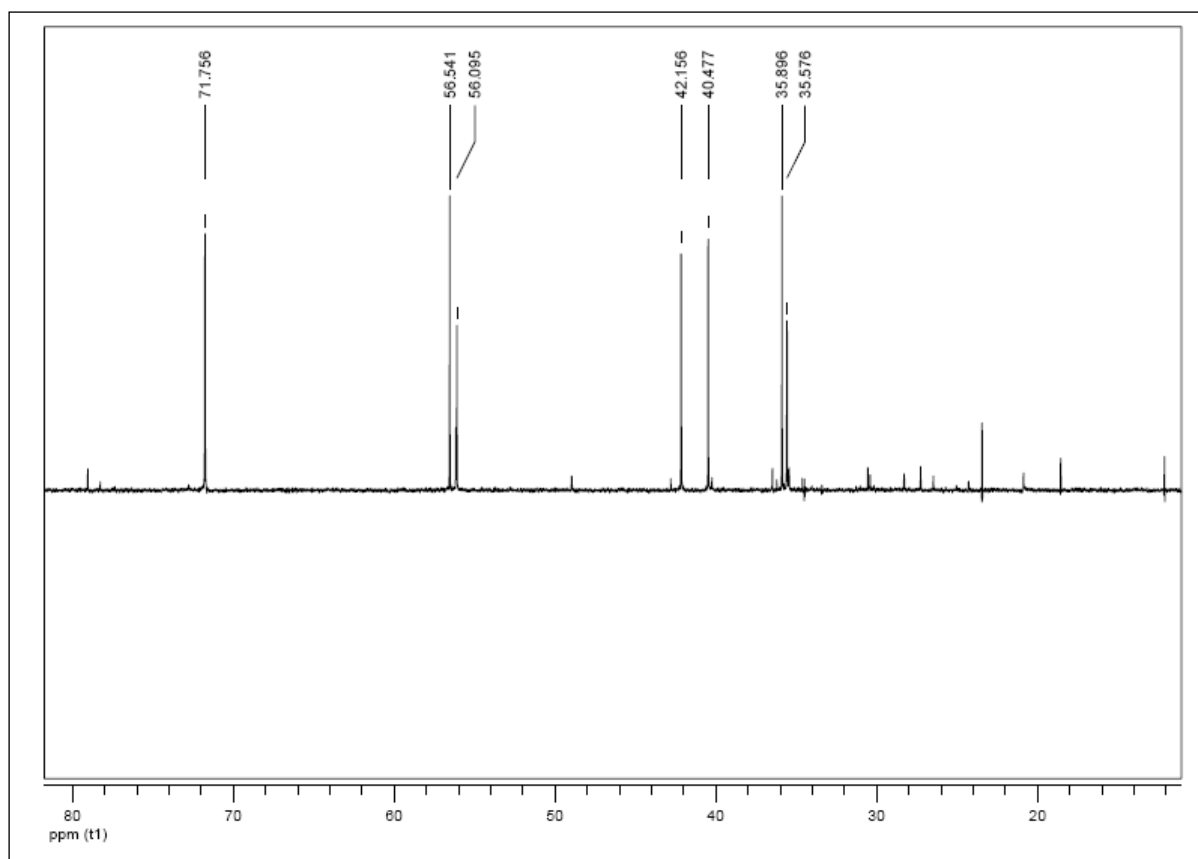


Abbildung 298: DEPT-90-NMR (125.7 MHz, CDCl_3): Lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid (71).

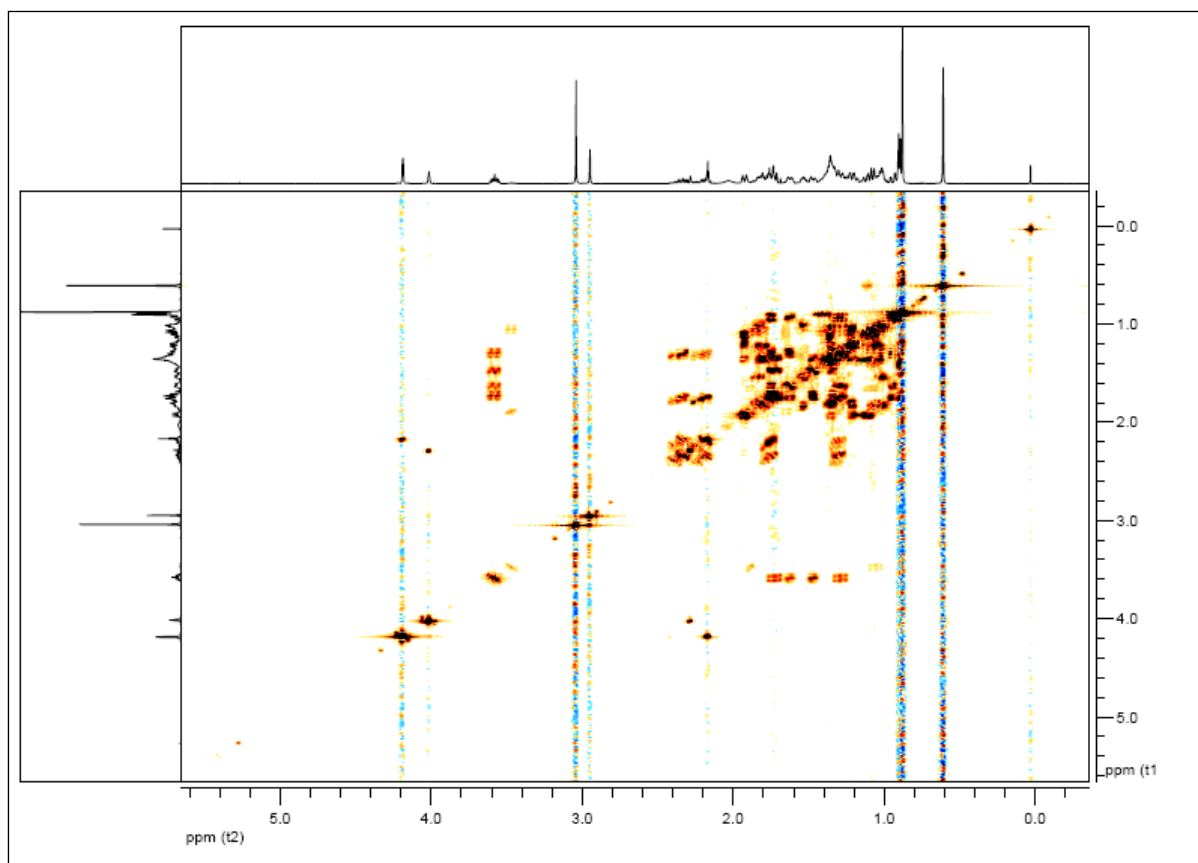


Abbildung 299: H-H-COSY (300 MHz, CDCl₃): Lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid (71).

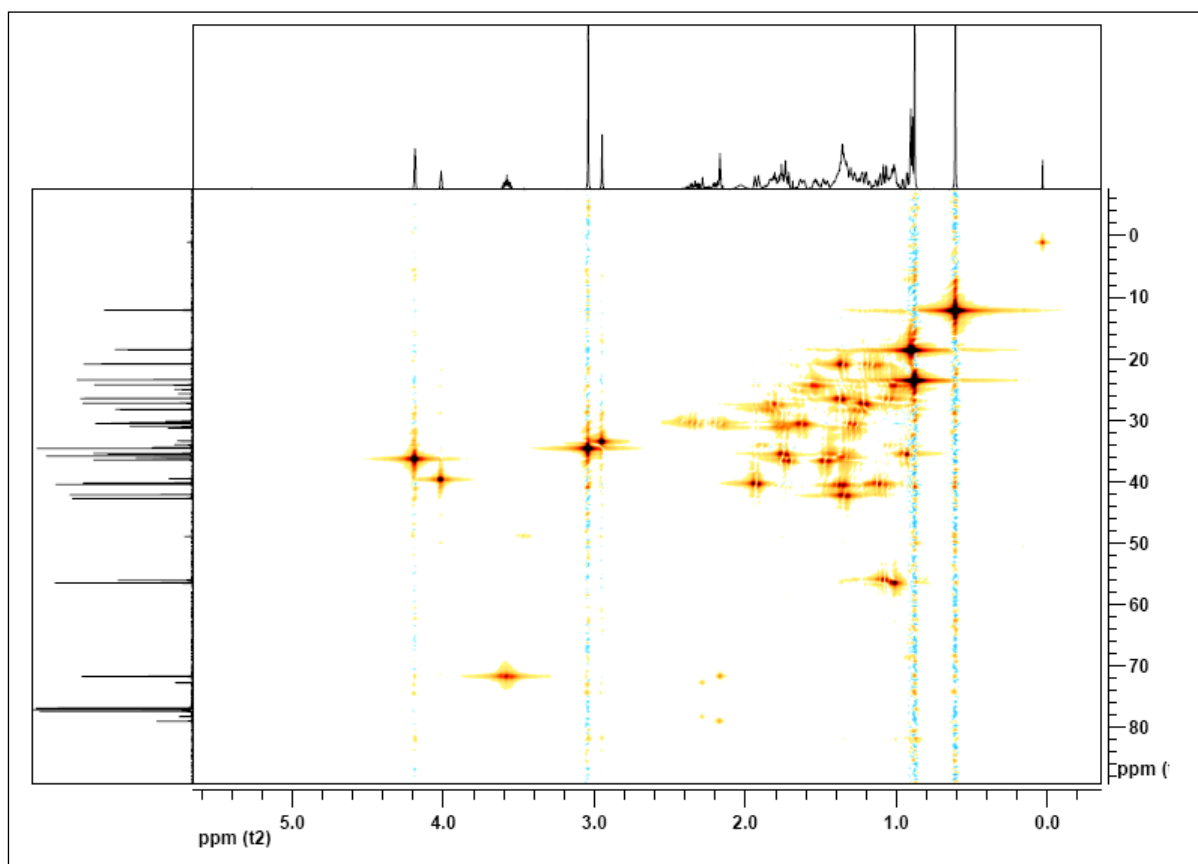


Abbildung 300: HMQC (CDCl₃): Lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid (71).

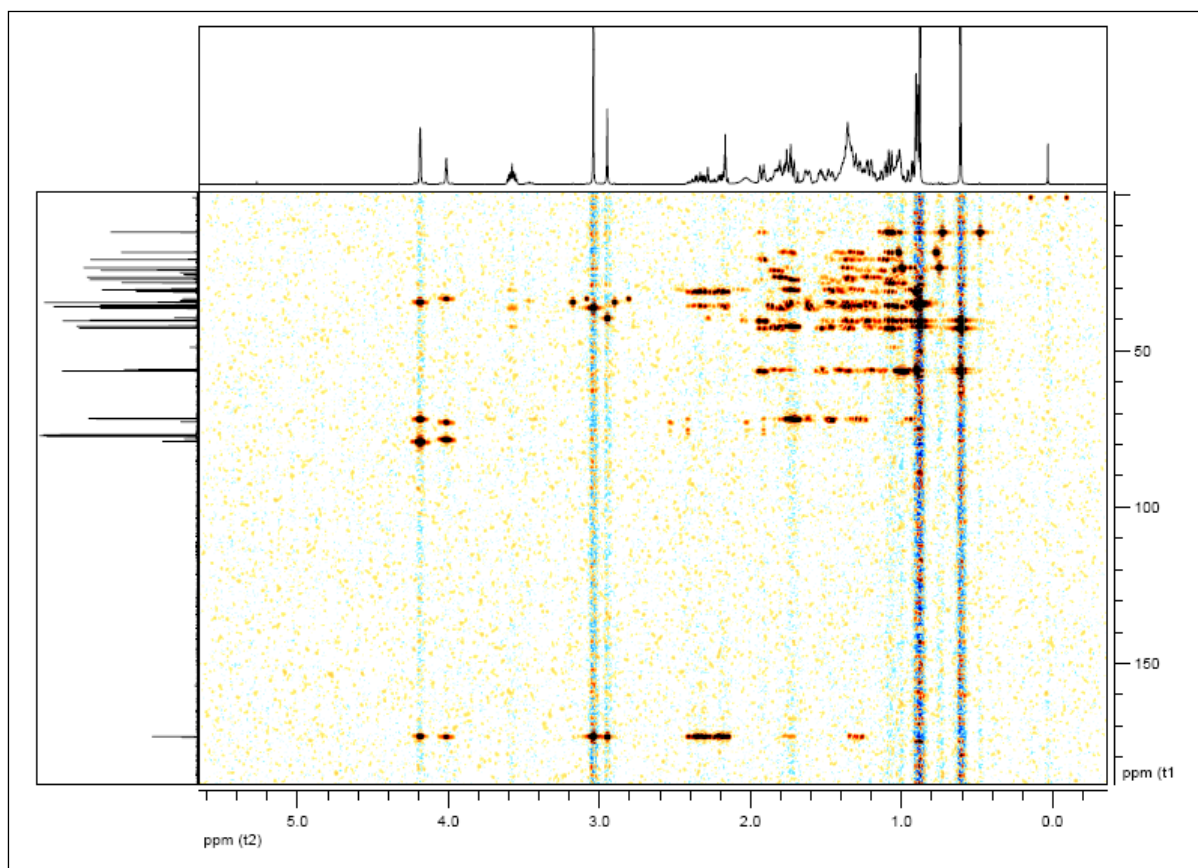


Abbildung 301: HMBC (CDCl₃): Lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid (71).

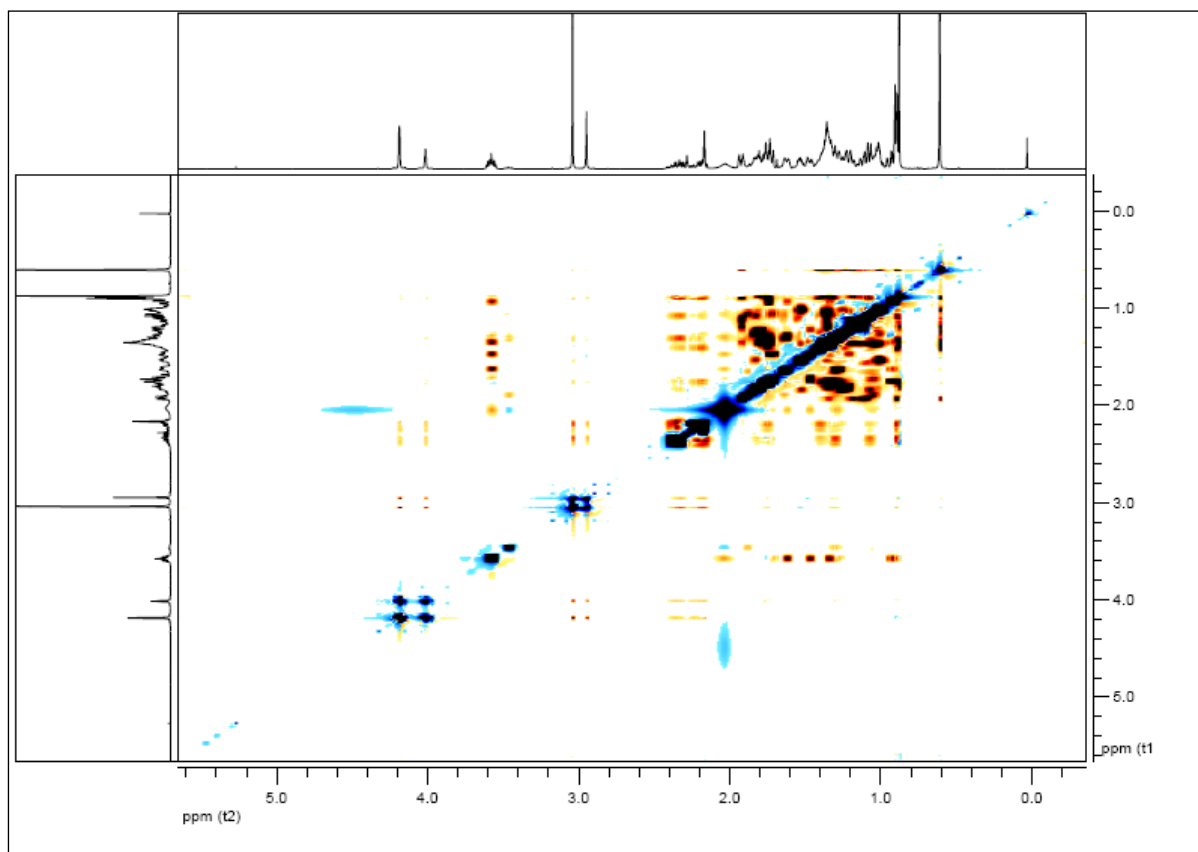
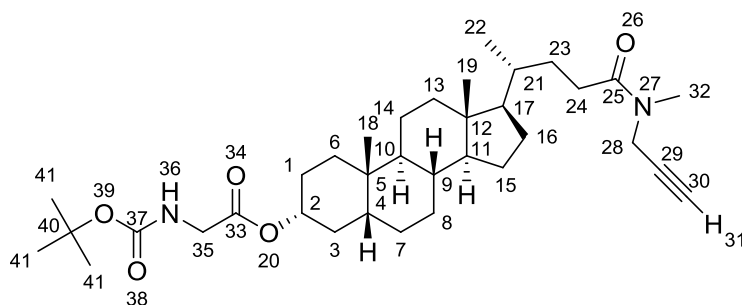


Abbildung 302: NOESY (CDCl₃): Lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid (71).

5.3.1.2 *N*-Boc-glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid **72****Ansatz:**

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
<i>N</i> -Boc-glycin	175.15	1.0	2.284	0.4	
71 (5.3.1.1)	427.66	1.2	2.741	1.172	
HCTU	413.69	1.2	2.741	1.134	
Cl-HOBt	169.57	2.5	5.709	0.968	
DIEA	129.25	3.0	6.851	0.886	1.193
CH ₂ Cl ₂					20.0
DMF					10.0

Durchführung:

0.4 g *N*-Boc-glycin (2.284 mmol, 1 eq.) wurden in 30 mL eines 2:1-Gemisches aus Dichlormethan und *N,N'*-Dimethylformamid gelöst. Die Lösung wurde im Eisbad auf 0 °C gekühlt und mit 1.134 g HCTU (2.741 mmol, 1.2 eq.) und 0.968 g Cl-HOBt (5.709 mmol, 2.5 eq.) versetzt. Nachdem sich eine klare Lösung gebildet hatte, wurden 1.193 mL DIEA (0.886 g, 6.851 mmol, 3 eq.) zugegeben und das gelbe Gemisch für 10 min bei 0 °C gerührt. Nach Zugabe von 1.172 g Lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid (**71**) (2.741 mmol, 1.2 eq.) wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmt und für weitere 40 h gerührt. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels DC überprüft. Die Reaktionslösung wurde mit 30 mL Dichlormethan verdünnt. Die organische Phase wurde mit je 60 mL gesättigter NaHCO₃-Lösung, 1 M Salzsäure, und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden mit Dichlormethan gegenextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das gelbliche Rohprodukt (1.8 g) wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet und anschließend säulenchromatographisch gereinigt (*n*-Hexan : Ethylacetat = 1:1). Es wurden 1.127 g (1.927 mmol) eines feinkristallinen, farblosen Feststoffs isoliert.

Analytik:

Ausbeute: 84 %. **R_F:** 0.81 (*n*-Hexan : Ethylacetat = 1:1). **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ = 0.64 (s, 3H, H-19), 0.93 (m, 6H, H-18, H-22), 0.92-0.99 (m, 1H, H-6), 1.03-1.23 (m, 8H, H-7, H-8, H-11, H-13, H-14, H-15, H-16, H-17), 1.25-1.43 (m, 8H, H-1, H-4, H-8, H-9, H-10, H-14, H-23), 1.45 (s, 9H, H-41), 1.45-1.49 (m, 1H, H-3), 1.51-1.55 (m, 1H, H-15), 1.60-1.63 (m, 1H, H-1), 1.69-1.87 (m, 5H, H-3, H-6, H-7, H-16, H-21), 1.90-1.93 (m, 1H, H-13), 2.19 (t, $^4J_{HH}$ = 2.50 Hz, 0.7H, H-31), 2.20-2.28 (m, 1H, H-24), 2.29 (t, $^4J_{HH}$ = 2.32 Hz, 0.3H, H-31), 2.33-2.44 (m, 1H, H-24), 2.98 (s, 1H, H-32), 3.07 (s, 2H, H-32), 3.86 (d, $^3J_{HH}$ = 5.18 Hz, 2H, H-35), 4.04 (t, $^4J_{HH}$ = 2.12 Hz, 0.7H, H-28), 4.22 (t, $^4J_{HH}$ = 2.12 Hz, 1.3H, H-28), 4.71-4.84 (m, 1H, H-2), 5.01 (m, 1H, H-36). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, CDCl₃): δ = 12.2 (C19), 18.6 (C22), 21.0 (C14), 23.4 (C18), 24.3 (C15), 26.4 (C8), 26.7 (C7), 27.1 (C16), 28.5 (C41), 30.3 (C24), 30.5 (C1), 31.1 (C24), 31.4 (C23), 32.3 (C23), 33.5 (C32), 34.5 (C32), 34.7 (C5), 35.1 (C6), 35.7 (C21), 35.7 (C9), 35.9 (C28), 36.3 (C3), 39.6 (C28), 40.3 (C13), 40.6 (C10), 42.0 (C4), 42.8 (C35), 42.9 (C12), 56.3 (C17), 56.6 (C11), 71.7 (C30), 72.8 (C30), 75.8 (C2), 78.4 (C29), 79.1 (C29), 80.0 (C40), 155.8 (C37), 169.9 (C33), 173.4 (C25). **IR** (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3299 (s), 2930 (m), 2866 (w), 1748 (m), 1716 (m), 1647 (m), 1508 (w), 1450 (w), 1388 (w), 1364 (m), 1252 (m), 1202 (m), 1163 (s), 1054 (w), 986 (w). **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für C₃₅H₅₆N₂O₅Na: m/z 607.4081, gef.: m/z 607.4134.

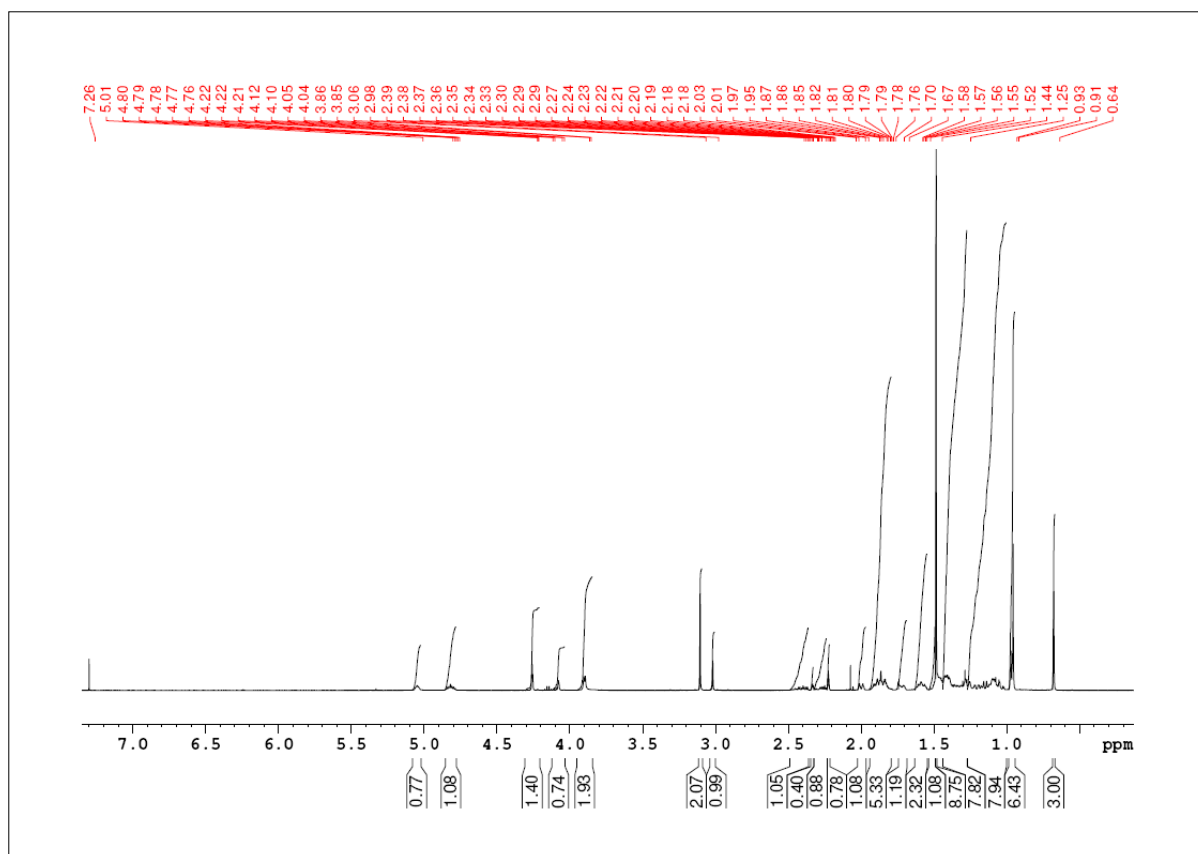


Abbildung 303: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): *N*-Boc-glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid 72.

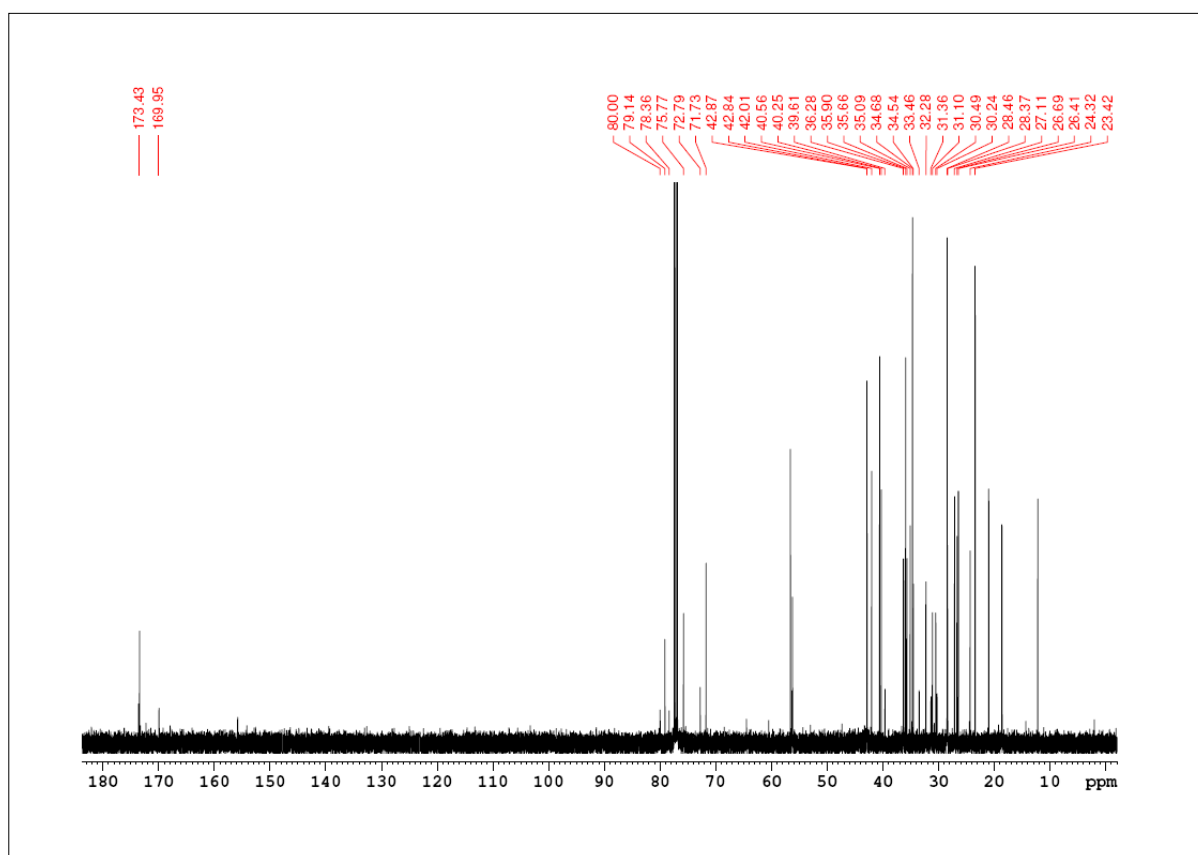
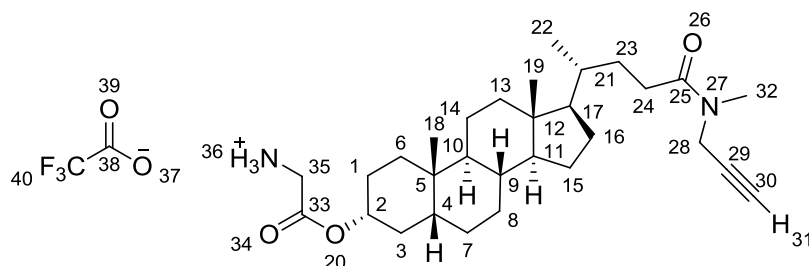


Abbildung 304: ¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃): *N*-Boc-glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid 72.

5.3.1.3 Trifluoracetat-glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid **73**



Ansatz:

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
72 (5.3.1.2)	584.83	1.0	0.086	0.05	
TFA					2.0
CH ₂ Cl ₂					10.0
Benzol					40.0

Durchführung:

0.05 g *N*-Boc-glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid **72** (0.086 mmol, 1.0 eq.) wurden in 10 mL Dichlormethan gelöst und mit 2 mL Trifluoressigsäure versetzt. Die Reaktionslösung wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt und der Reaktionsfortschritt mittels DC überprüft. Die Lösung wurde mit 10 mL absolutem Benzol verdünnt und anschließend am Rotationsverdampfer auf 2 mL eingengt. Das so erhaltene Konzentrat wurde dreimal mit je 10 mL Benzol aufgenommen und wiederum eingengt, um die überschüssige Trifluoressigsäure im azeotropen Gemisch vollständig zu entfernen. Das Produkt wurde 48 h im Ölpumpenvakuum getrocknet. Es konnten 0.0507 g (0.085 mmol) eines farblosen Feststoffs erhalten werden.

Analytik:

Ausbeute: 99 %. **R_F:** 0.21 (Dichlormethan : Methanol = 9:1). **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄ = 5:1): δ = 0.46 (s, 3H, H-19), 0.74 (m, 6H, H-18, H-22), 0.82-0.89 (m, 1H, H-6), 0.91-1.13 (m, 8H, H-7, H-8, H-11, H-13, H-14, H-15, H-16, H-17), 1.14-1.33 (m, 8H, H-1, H-4, H-8, H-9, H-10, H-14, H-23), 1.35-1.38 (m, 1H, H-3), 1.42-1.45 (m, 1H, H-15), 1.50-1.54 (m, 1H, H-1), 1.59-1.97 (m, 5H, H-3, H-6, H-7, H-16, H-21), 1.81-1.83 (m, 1H, H-13), 1.95-2.08 (m, 1H, H-24), 2.12 (t, ⁴J_{HH} = 2.45 Hz, 0.7H, H-31), 2.14-2.24 (m, 1H, H-24), 2.23 (t, ⁴J_{HH} = 2.36 Hz, 0.3H, H-31), 2.77 (s, 1H, H-32), 2.89 (s, 2H, H-32), 3.51 (s, 2H, H-35), 3.89 (s, 0.7H, H-28), 3.98 (s, 1.3H, H-28), 4.59-4.67 (m, 1H, H-2). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, CDCl₃): δ = 12.1 (C19), 18.5 (C22), 20.9 (C14), 23.3 (C18), 24.3 (C15), 26.5 (C8), 26.6 (C7), 27.1 (C16), 29.9 (C24), 30.4 (C1), 30.6 (C24), 30.8 (C23), 31.2 (C32), 32.1 (C32), 34.7 (C5), 34.8 (C5), 34.8 (C6), 35.0 (C21), 35.8 (C9), 36.0 (C28), 36.5 (C3), 40.3 (C28), 40.3 (C13), 40.5 (C35), 40.7 (C10), 42.1 (C4), 42.9 (C12), 56.2 (C17), 56.7 (C11), 72.2 (C30), 77.4 (C2), 78.6 (C29), 78.7 (C29), 117.2 (C38), 162.9 (C37), 166.8 (C33), 174.5 (C25). **IR** (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3299 (w), 2930 (s), 2865 (s), 2359 (s), 1979 (s), 1748 (m), 1677 (s), 1633 (m), 1538 (s), 1404 (m), 1378 (s), 1240 (s), 1200 (s), 1171 (s), 1123 (s), 1055 (s), 976 (s), 914 (s), 833 (s), 797 (s), 721 (s). **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für C₃₀H₄₉N₂O₃: m/z 485.3690, gef.: m/z 485.3701.

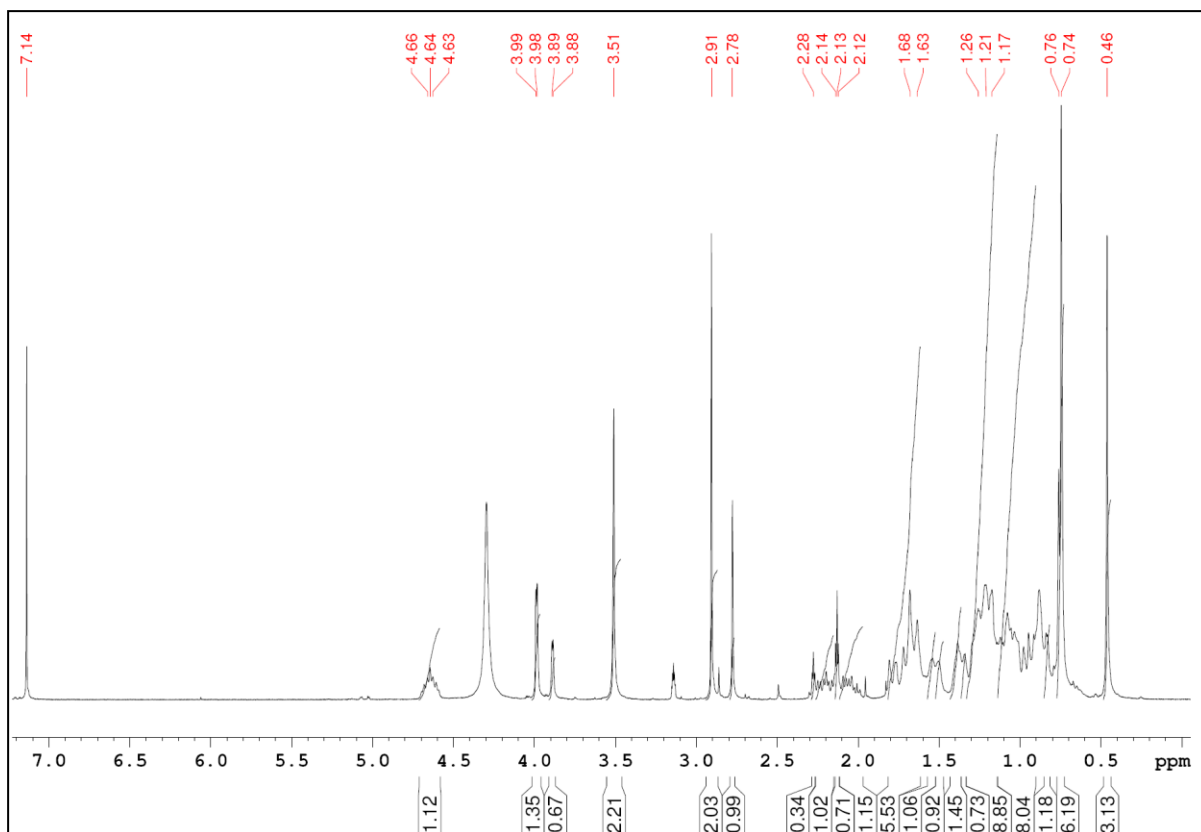


Abbildung 305: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄ = 5:1): Trifluoracetat-glycin-lithocholsäure-N-methylpropargylamid 73.

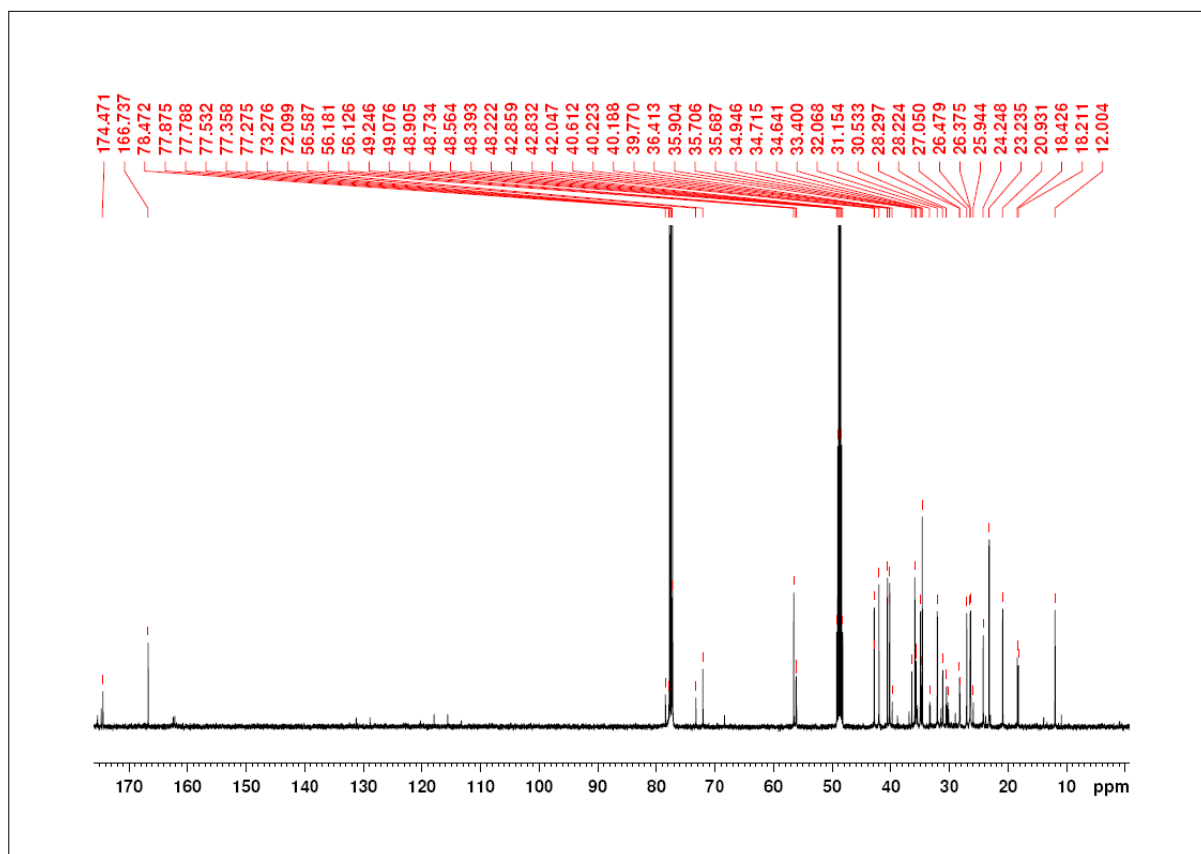
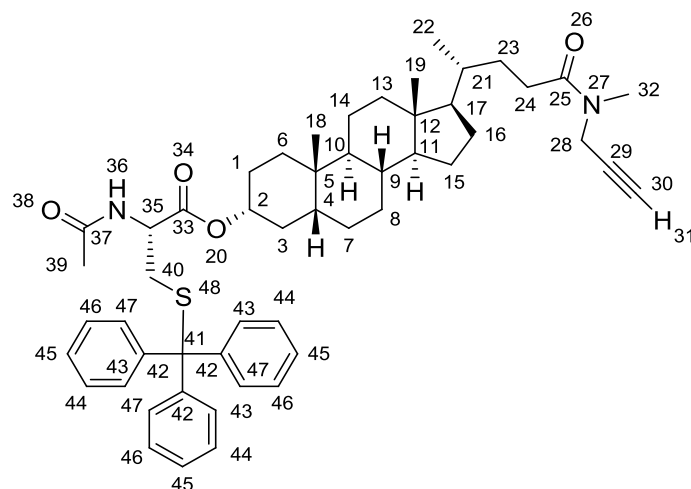


Abbildung 306: ¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄ = 5:1): Trifluoracetat-glycin-lithocholsäure-N-methylpropargylamid 73.

5.3.1.4 *N*-Acetyl-cystein-(*S*-trityl)-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid **140**Ansatz:

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
<i>N</i> -Acetyl-cystein-(<i>S</i> -trityl)-OH	405.51	1.0	2.286	0.927	
71 (5.3.1.1)	427.66	1.2	2.743	1.173	
HCTU	413.69	1.2	2.743	1.135	
Cl-HOBt	169.57	2.5	5.715	0.969	
DIEA	129.25	3.0	6.858	0.887	1.194
CH ₂ Cl ₂					20.0
DMF					10.0

Durchführung:

0.927 g *N*-Acetyl-cystein-(*S*-trityl)-OH (2.286 mmol, 1 eq.) wurden in 30 mL eines 2 : 1- Gemisches aus Dichlormethan und *N,N'*-Dimethylformamid gelöst. Die Lösung wurde im Eisbad auf 0 °C gekühlt und mit 1.135 g HCTU (2.743 mmol, 1.2 eq.) und 0.969 g Cl-HOBt (5.715 mmol, 2.5 eq.) versetzt. Nachdem sich eine klare Lösung gebildet hatte, wurden 1.194 mL DIEA (0.887 g, 6.858 mmol, 3 eq.) zugegeben und das gelbe Gemisch für 10 min bei 0 °C gerührt. Nach Zugabe von 1.172 g Lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid (**71**) (2.743 mmol, 1.2 eq.) wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmt und für weitere 24 h gerührt. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels DC überprüft. Die Reaktionslösung wurde mit 30 mL Dichlormethan verdünnt. Die organische Phase wurde mit je 60 mL gesättigter NaHCO₃-Lösung, 1 M Salzsäure und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden mit Dichlormethan gegenextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das gelbliche Rohprodukt (2.3 g) wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet und anschließend

säulenchromatographisch gereinigt (Dichlormethan : Methanol = 40:1; mobile Phase DC: *n*-Hexan : Ethylacetat = 3:1). Es wurden 0.917 g (1.125 mmol) des feinkristallinen, farblosen Feststoffs isoliert.

Analytik:

Ausbeute: 50 %. **R_F:** 0.05 (*n*-Hexan : Ethylacetat = 3:1), 0.75 (Dichlormethan : Methanol = 40:1). **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ = 0.63 (s, 3H, H-19), 0.90 (s, 3H, H-18), 0.92 (d, ³J_{HH} = 6.39 Hz, 3H, H-22), 0.92-0.99 (m, 1H, H-6), 1.01-1.23 (m, 8H, H-7, H-8, H-11, H-13, H-14, H-15, H-16, H-17), 1.25-1.43 (m, 8H, H-1, H-4, H-8, H-9, H-10, H-14, H-23), 1.45-1.49 (m, 1H, H-3), 1.51-1.55 (m, 1H, H-15), 1.60-1.63 (m, 1H, H-1), 1.69-1.87 (m, 5H, H-3, H-6, H-7, H-16, H-21), 1.90-1.94 (m, 1H, H-13), 1.93 (s, 3H, H-39), 2.17 (t, ⁴J_{HH} = 2.04 Hz, 0.7H, H-31), 2.13-2.26 (m, 1H, H-24), 2.27 (t, ⁴J_{HH} = 2.04 Hz, 0.3H, H-31), 2.27-2.40 (m, 1H, H-24), 2.48 (dd, ²J_{HH} = 12.60 Hz, ³J_{HH} = 4.43 Hz, 1H, H-40), 2.65 (ddd, ²J_{HH} = 12.60 Hz, ³J_{HH} = 4.43 Hz, ³J_{HH} = 5.52 Hz, 1H, H-40), 2.96 (s, 1H, H-32), 3.05 (s, 2H, H-32), 4.02 (d, ⁴J_{HH} = 2.04 Hz, 0.6H, H-28), 4.20 (d, ⁴J_{HH} = 2.04 Hz, 1.3H, H-28), 4.46 (ddd, ³J_{HH} = 5.53 Hz, ³J_{HH} = 4.43 Hz, ³J_{HH} = 7.61 Hz, 1H, H-35), 4.63-4.91 (m, 1H, H-2), 5.91 (d, ³J_{HH} = 7.61 Hz, 1H, H-36), 7.17-2.29 (m, 9H, H-43, H-45, H-47), 7.34 (m, 6H, H-44, H-46). **¹³C-NMR** (125.8 MHz, CDCl₃): δ = 12.2 (C19), 18.7 (C22), 21.0 (C14), 23.3 (C39), 23.5 (C18), 24.4 (C15), 26.5 (C8), 26.7 (C7), 27.1 (C16), 30.5 (C24), 30.6 (C1), 31.1 (C24), 32.1 (C23), 32.2 (C23), 33.3 (C32), 34.2 (C32), 34.3 (C40), 34.5 (C6), 35.7 (C21), 35.1 (C5), 35.7 (C9), 35.9 (C28), 36.3 (C3), 39.6 (C28), 40.3 (C13), 40.6 (C10), 42.0 (C4), 42.9 (C12), 51.3 (C35), 56.3 (C17), 56.7 (C11), 66.9 (C41), 71.8 (C30), 72.8 (C30), 76.4 (C2), 78.1 (C29), 79.2 (C29), 127.0 (C45), 128.1 (C43, C47), 129.6 (C44, C46), 144.5 (C42), 169.6 (C37), 170.1 (C33), 173.4 (C25). **IR (ATR):** $\tilde{\nu}$ = 3293 (w), 3055 (w), 2930 (m), 2865 (m), 2360 (m), 2341 (m), 2161 (w), 2025 (w), 1738 (m), 1645 (s), 1488 (m), 1445 (m), 1374 (w), 1339 (w), 1261 (w), 1204 (m), 1182 (m), 1119 (w), 1083 (w), 1035 (w), 980 (w), 941 (w), 846 (w), 742 (s), 699 (s), 675 (m). **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für C₅₂H₆₆N₂O₄SNa: m/z 837.4636, gef.: m/z 837.4694.

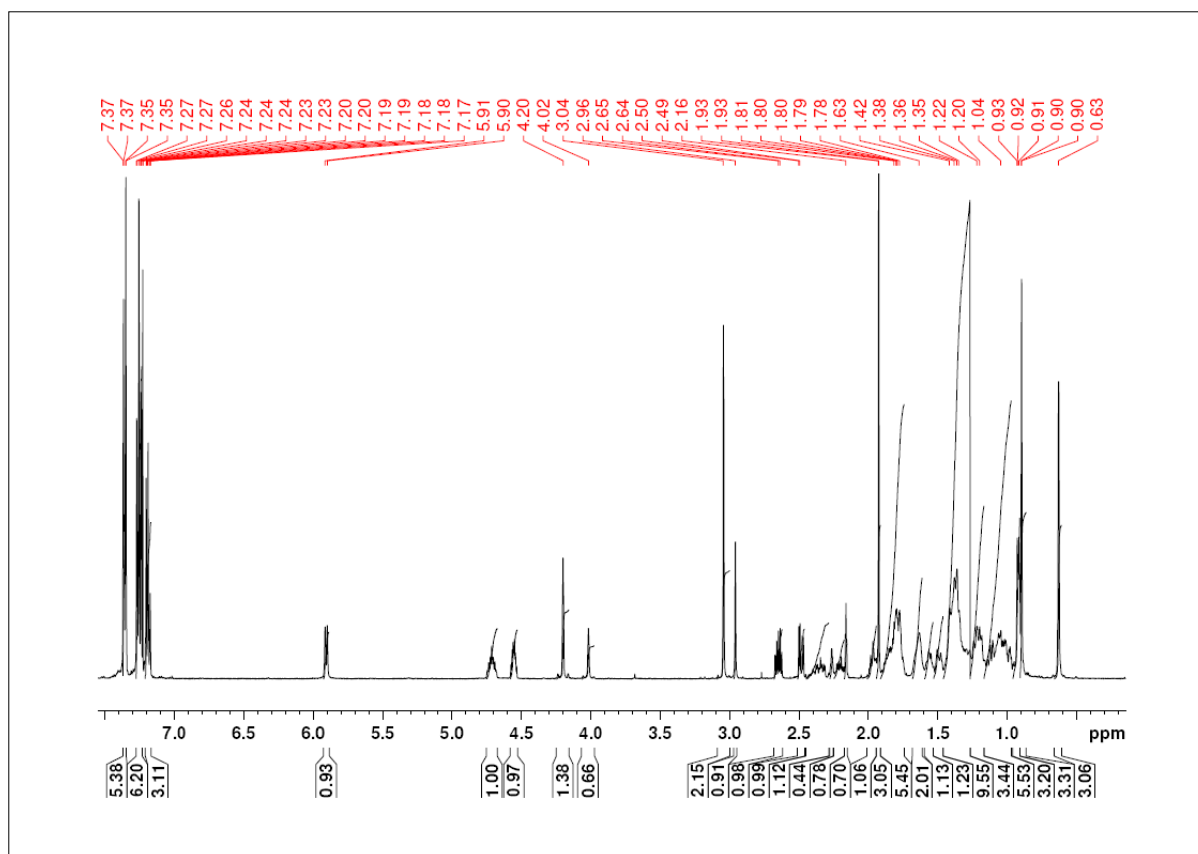


Abbildung 307: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): *N*-Acetyl-cystein-(*S*-trityl)-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid 140.

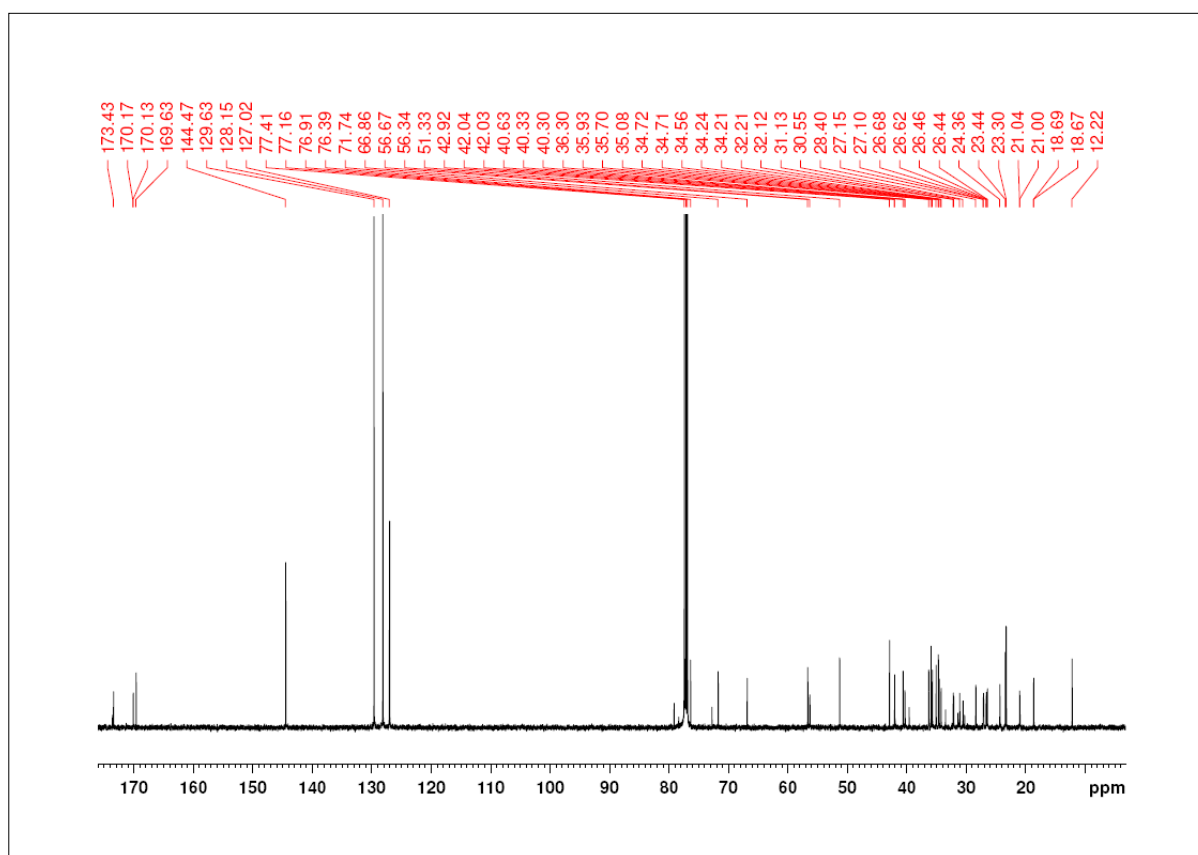
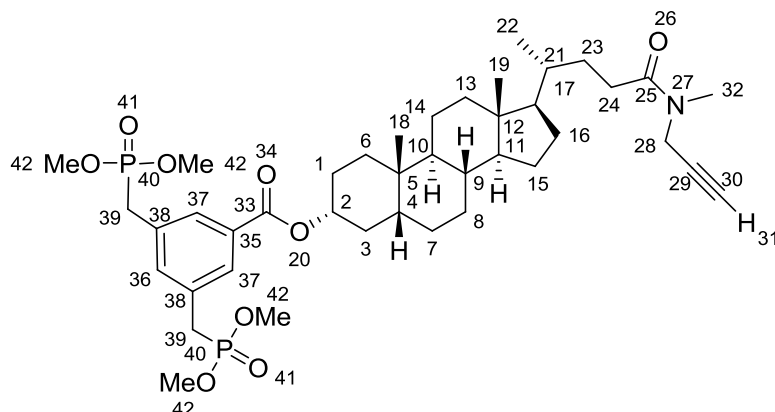


Abbildung 308: ¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): *N*-Acetyl-cystein-(*S*-trityl)-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid 140.

5.3.1.5 BP-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid **75**



Ansatz:

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
BP-COOH 74	366.25	1.2	1.122	0.411	
71 (5.3.1.1)	427.66	1.0	0.936	0.400	
HCTU	413.69	1.2	1.122	0.464	
Cl-HOBt	169.57	2.5	2.338	0.397	
DIEA	129.25	3.0	2.806	0.363	0.489
CH ₂ Cl ₂					12.0
DMF					6.0

Durchführung:

0.411 g 3,5-Bis-(dimethoxy-phosphorylmethyl)benzoesäure **74** (1.122 mmol, 1.2 eq.), 0.464 g HCTU (1.122 mmol, 1.2 eq.) und 0.397 g Cl-HOBt (2.338 mmol, 2.5 eq.) wurden in einem Gemisch aus 12 mL Dichlormethan und 6 mL *N,N*-Dimethylformamid gelöst und im Eisbad auf 0 °C gekühlt. Die Lösung wurde mit 0.489 mL DIEA (0.363 g, 2.806 mmol, 3 eq.) versetzt und weitere 10 min bei 0 °C gerührt. Zu der leicht gelben Lösung wurden 0.400 g Lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid (**71**) (0.936 mmol, 1.0 eq.) zugegeben. Die Reaktionslösung wurde langsam auf Raumtemperatur erwärmt und für weitere 24 h gerührt. Der Fortschritt der Reaktion wurde mittels DC überprüft. Zur Aufarbeitung wurde das Gemisch mit 20 mL Dichlormethan verdünnt und mit je 30 mL gesättigter NaHCO₃-Lösung, und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden mit Dichlormethan gegenextrahiert, die erhaltenen organischen Phasen vereinigt und über MgSO₄ getrocknet. Das Trocknungsmittel wurde abgetrennt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das gelbliche, hochviskose Öl (1.1 g) wurde im Hochvakuum getrocknet. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte säulenchromatographisch. Hierbei wurden zuerst Reste der Edukte

und der Kupplungsreagenzien in reinem Ethylacetat abgetrennt. Zur eigentlichen Reinigung wurde als mobile Phase ein Laufmittelgemisch aus Dichlormethan : Methanol = 19:1 verwendet. 0.682 g (0.879 mmol) des Produktes konnten in Form eines farblosen, kristallinen Feststoffs isoliert werden.

Analytik:

Ausbeute: 79 %. **R_F:** 0.16 (Dichlormethan : Methanol = 19:1). **Schmp.:** 92 °C. **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ = 0.57 (s, 3H, H-19), 0.84 (m, 6H, H-18, H-22), 0.90-0.98 (m, 1H, H-6), 1.00-1.21 (m, 8H, H-7, H-8, H-11, H-13, H-14, H-15, H-16, H-17), 1.23-1.42 (m, 8H, H-1, H-4, H-8, H-9, H-10, H-14, H-23), 1.44-1.47 (m, 1H, H-3), 1.48-1.54 (m, 1H, H-15), 1.60-1.63 (m, 1H, H-1), 1.66-1.88 (m, 5H, H-3, H-6, H-7, H-16, H-21), 1.90-1.93 (m, 1H, H-13), 2.14-2.21 (m, 1H, H-24), 2.14 (t, ⁴J_{HH} = 2.47 Hz, 0.7H, H-31), 2.23-2.39 (m, 1H, H-24), 2.27 (t, ⁴J_{HH} = 2.19 Hz, 0.3H, H-31), 2.89 (s, 1H, H-32), 2.98 (s, 2H, H-32), 3.12 (d, ²J_{PH} = 21.8 Hz, 4H, H-39), 3.59 (d, ²J_{PH} = 10.8 Hz, 12H, H-42), 3.96 (m, 0.7H, H-28), 4.12 (m, 1.3H, H-28), 4.80-4.89 (m, 1H, H-2), 7.41 (bs, 1H, H-36), 7.73 (bs, 2H, H-37). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, CDCl₃): δ = 11.9 (C19), 18.4 (C22), 20.7 (C14), 23.2 (C18), 24.0 (C15), 26.1 (C8), 26.9 (C7), 28.1 (C16), 29.9 (C24), 30.1 (C1), 30.8 (C24), 31.8 (C23), 32.1 (C23), 32.9 (C32), 33.0 (d, ¹J_{PC} = 115.3 Hz, C39), 34.2 (C6), 34.4 (C32), 34.9 (C21), 35.3 (C5), 35.6 (C9), 36.0 (C28), 38.4 (C3), 39.3 (C28), 39.9 (C13), 40.3 (C10), 41.8 (C4), 42.6 (C12), 52.8 (d, ²J_{PC} = 6.1 Hz, C42), 55.8 (C17), 56.3 (C11), 71.5 (C30), 72.5 (C30), 75.1 (C2), 78.0 (C29), 78.8 (C29), 129.4 (C37), 131.6 (C35), 131.9 (C38), 135.0 (C36), 165.3 (C33), 173.2 (C25). **³¹P-NMR** (121.5 MHz, CDCl₃): δ = 28.1. **IR** (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3451 (w), 3258 (w), 2930 (m), 2855 (m), 2200 (w), 1711 (m), 1650 (m), 1604 (w), 1526 (w), 1451 (m), 1380 (w), 1306 (m), 1245 (s), 1209 (s), 1110 (w), 1204 (s), 901 (m), 851 (m), 804 (s), 722 (m), 693 (m). **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für C₄₁H₆₃NO₉P₂Na: m/z 798.3876, gef.: m/z 798.3881.

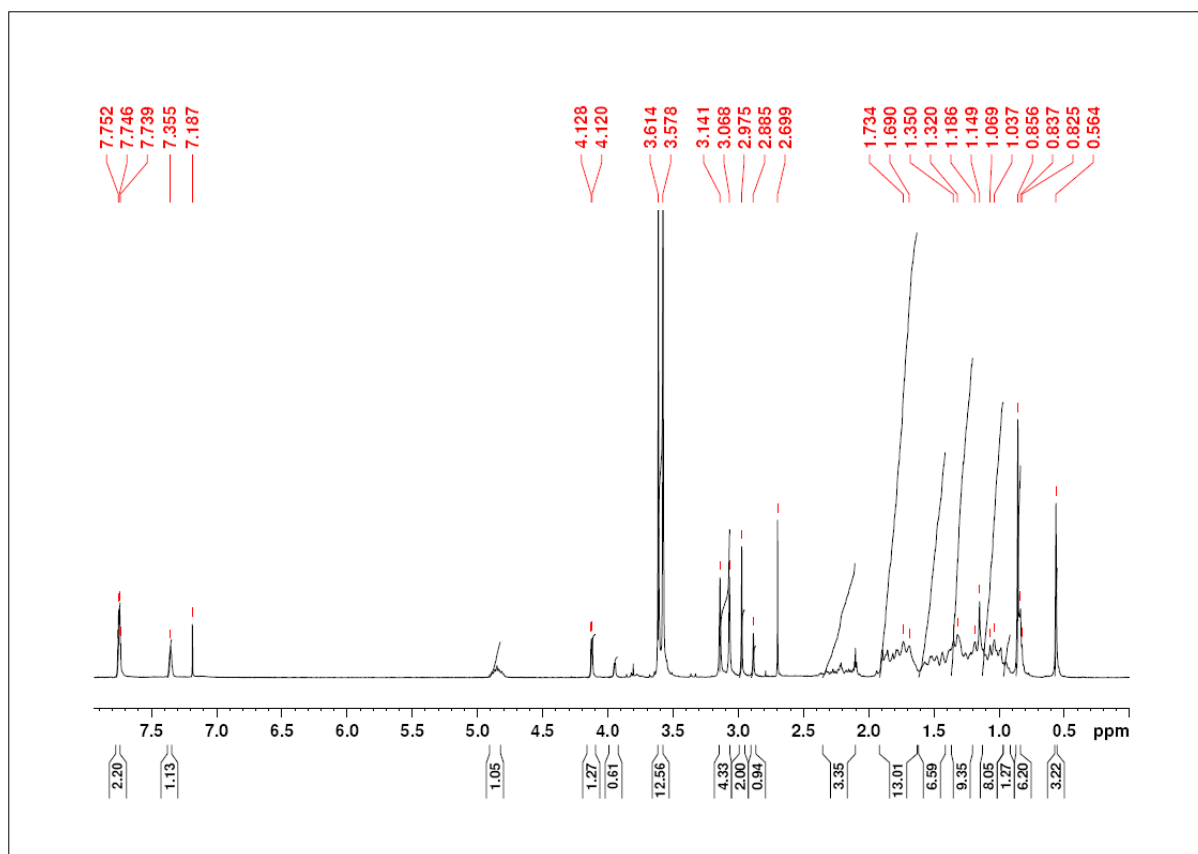


Abbildung 309: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): BP-lithocholsäure-N-methylpropargylamid 75.

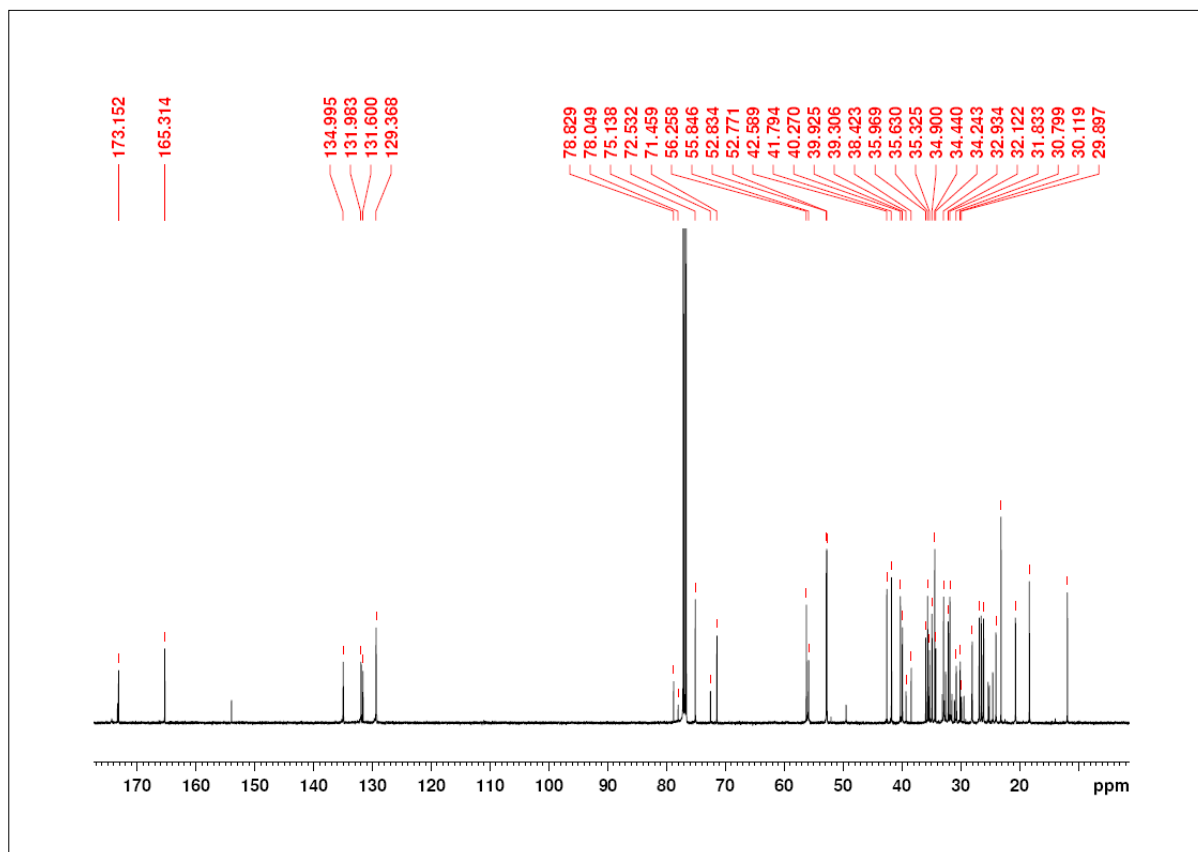
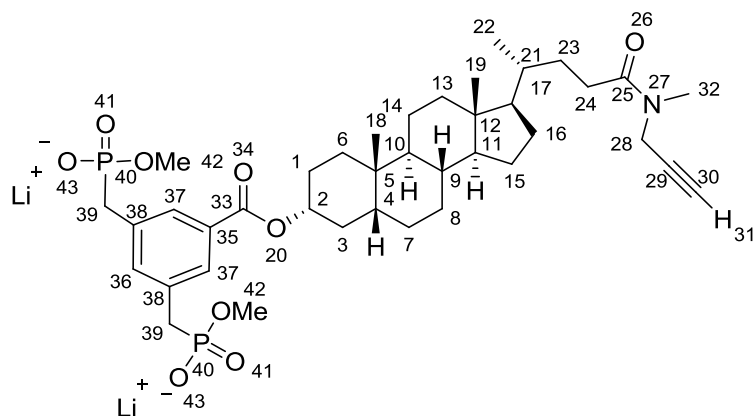


Abbildung 310: ¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃): BP-lithocholsäure-N-methylpropargylamid 75.

5.3.1.6 BP(OLi)₂-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid 76Ansatz:

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
75 (5.3.1.5)	775.89	1.0	0.131	0.1	
LiBr	86.84	2.2	0.288	0.026	
Acetonitril					10.0

Durchführung:

0.1 g BP-Lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid **75** (0.131 mmol, 1 eq.) wurden in 10 mL Acetonitril gelöst und mit 0.026 g trockenem LiBr (0.288 mmol, 2.2 eq.) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 72 h unter Rückfluss erhitzt. Dabei fiel das Produkt als farbloser Feststoff aus. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels DC überprüft. Nach vollständiger Umsetzung des Edukts wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur gekühlt und der Feststoff samt Reaktionslösung in ein Zentrifugenglas überführt. Der erhaltene Feststoff wurde abgetrennt und vier Mal mit je 10 mL Acetonitril und zweimal mit je 10 mL Diethylether gewaschen. Das farblose Produkt (0.098 g, 0.130 mmol) wurde gründlich im Hochvakuum getrocknet.

Analytik:

Ausbeute: 99 %. **Schmp.:** >230 °C. **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄ = 1:1): δ = 0.52 (s, 3H, H-19), 0.80 (d, 3H, ³*J*_{HH} = 5.41 Hz, H-22), 0.81 (s, 3H, H-18), 0.89-0.97 (m, 1H, H-6), 0.99-1.21 (m, 8H, H-7, H-8, H-11, H-13, H-14, H-15, H-16, H-17), 1.21-1.39 (m, 8H, H-1, H-4, H-8, H-9, H-10, H-14, H-23), 1.43-1.47 (m, 1H, H-3), 1.49-1.56 (m, 1H, H-15), 1.59-1.63 (m, 1H, H-1), 1.67-1.89 (m, 5H, H-3, H-6, H-7, H-16, H-21), 1.90-1.93 (m, 1H, H-13), 2.02-2.17 (m, 1H, H-24), 2.14 (t, ⁴*J*_{HH} = 2.19 Hz, 0.7H, H-31), 2.19-2.28 (m, 1H, H-24), 2.28 (t, ⁴*J*_{HH} = 2.19 Hz, 0.3H, H-31), 2.82 (s, 1H, H-32),), 2.83 (d, ²*J*_{PH} = 21.8 Hz, 4H, H-39), 2.95 (s, 2H, H-32), 3.40 (d, ²*J*_{PH} = 10.8 Hz, 6H, H-42), 3.91 (d, ⁴*J*_{HH} = 2.19 Hz, 0.7H, H-28), 4.12 (d, ⁴*J*_{HH} = 2.19 Hz, 1.3H, H-28), 4.69-4.77 (m, 1H, H-2), 7.46 (bs, 1H, H-36), 7.54 (bs, 2H, H-37). **¹³C-NMR** (125.8 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄ = 5:1): δ = 12.1 (C19), 18.5 (C22), 21.0 (C14), 23.4 (C18), 24.4 (C15), 26.5 (C8), 26.9 (C7), 27.2 (C16), 28.4 (C24), 30.4 (C1), 30.6 (C24), 31.2 (C23), 31.5 (C23), 32.5 (d, ¹*J*_{PC} = 115.3 Hz, C39), 33.5 (C32), 34.4 (C6), 34.7 (C32) 34.8 (C21), 35.2 (C5), 35.7 (C9), 36.0 (C28), 36.5 (C3), 39.9 (C28), 40.3 (C13), 40.7 (C10), 42.1 (C4), 42.9 (C12), 51.7 (d, ²*J*_{PC} = 6.1 Hz, C42), 56.1 (C17), 56.6 (C11), 72.1 (C30), 73.3 (C30), 75.4 (C2), 78.0 (C29), 78.6 (C29), 128.3 (C37), 130.6 (C35), 135.6 (C38), 136.0 (C36), 166.9 (C33), 173.4 (C25), 174.7 (C25). **³¹P-NMR** (121.5 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄ = 1:1): δ = 22.01. **IR (ATR):** $\tilde{\nu}$ = 2929 (w), 2866 (w), 2358 (w), 2340 (w), 2162 (w), 1980 (w), 1728 (m), 1631 (m), 1530 (w), 1445 (m), 1403 (w), 1382 (m), 1335 (m), 1244 (m), 1202 (s), 1095 (m), 1037 (m), 978 (m), 862 (s), 760 (w), 711 (m). **HRMS** (ESI neg., MeOH): ber. für C₃₉H₅₇NO₉P₂: m/z 372.6760, gef.: m/z 372.6785; (ESI pos., MeOH): ber. für C₃₉H₅₇NO₉P₂Na₃: m/z 814.3196, gef.: m/z 814.3253; ber. für C₃₉H₅₈NO₉P₂Na₂: m/z 792.3377, gef.: m/z 792.3390; ber. für C₃₉H₅₉NO₉P₂Na: m/z 770.3557, gef.: m/z 770.3606; ber. für C₃₉H₅₇NO₉P₂Li₃: m/z 766.3986, gef.: m/z 766.4125.

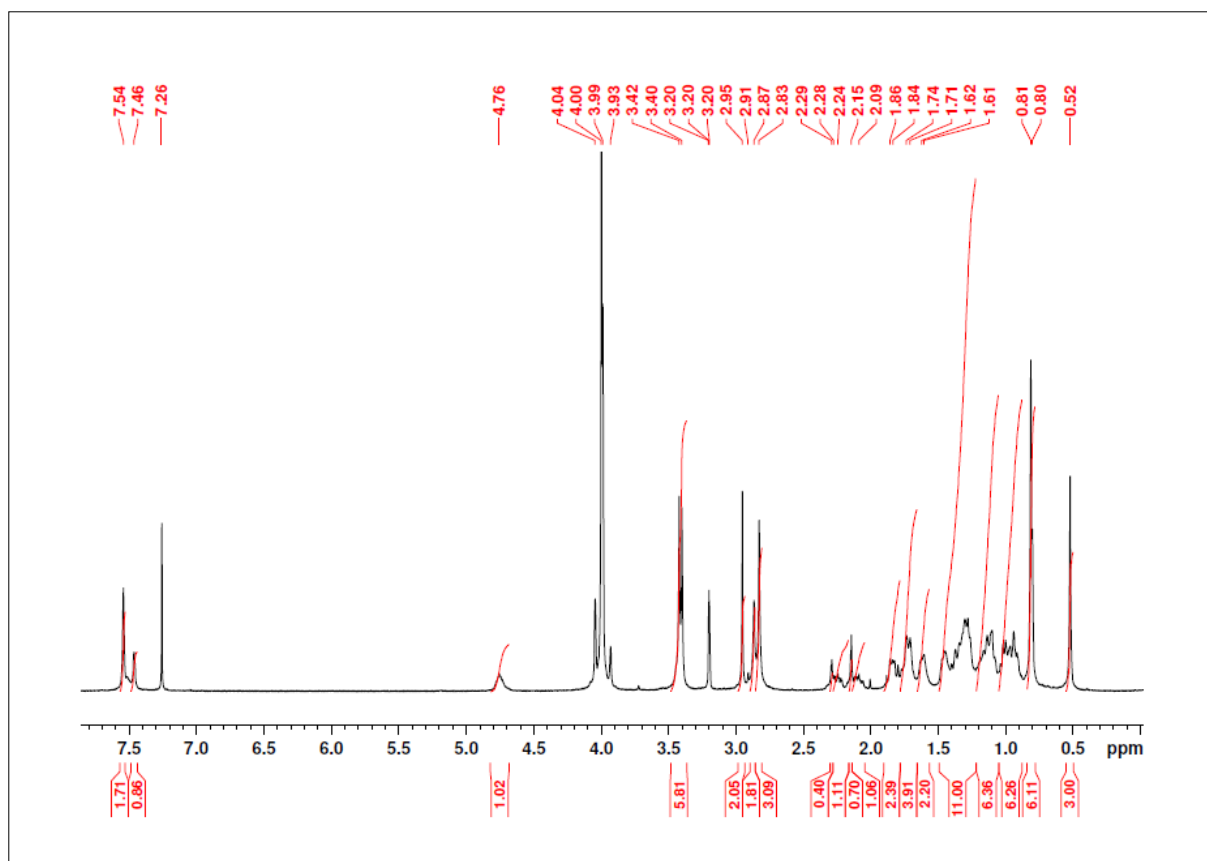


Abbildung 311: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄ = 1:1): BP(OLi)₂-lithocholsäure-N-methylpropargylamid 76.

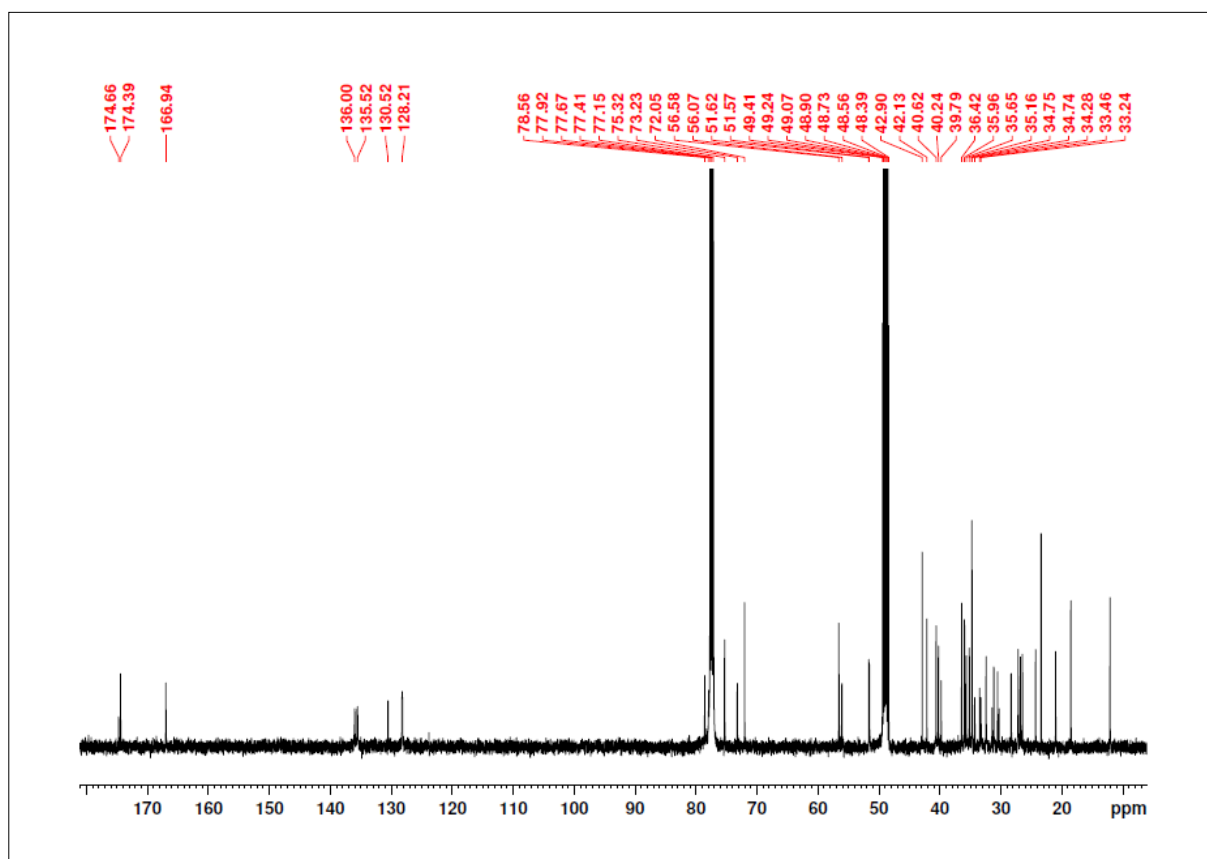
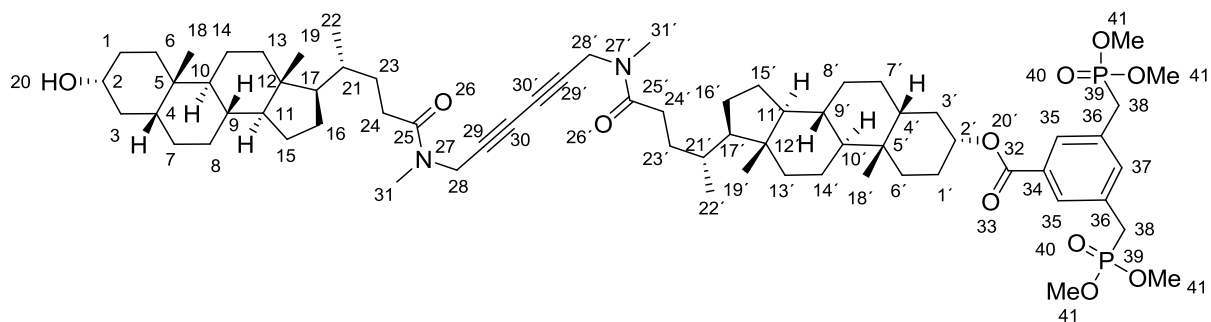


Abbildung 312: ¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄ = 1:1): BP(OLi)₂-lithocholsäure-N-methylpropargylamid 76.

5.3.1.7 BP-(lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-OH **189**



Ansatz:

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
71 (5.3.1.1)	427.66	1.0	0.234	0.1	
75 (5.3.1.5)	775.89	0.5	0.117	0.091	
CuCl	99.00	5.0	1.169	0.116	
TMEDA	116.20	5.0	1.169	0.136	0.176
CH ₂ Cl ₂					15.0

Durchführung:

0.1 g Lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid (**71**) (0.234 mmol, 1 eq.) und 0.091 g BP-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid **75** (0.117 mmol, 0.5 eq.) wurden in 15 mL Dichlormethan gelöst. Zu dieser Lösung wurde 0.116 g Kupfer(I)chlorid (1.169 mmol, 5 eq.) und 0.176 mL *N,N,N',N'*-Tetramethylethyldiamin (0.136 g, 1.169 mmol, 5.0 eq.) zugegeben. Es wurde solange bei Raumtemperatur gerührt, bis das Kupfer(I)chlorid vollständig in Lösung gegangen war. Hierbei färbte sich die Lösung hellgrün. Danach wurde die Atmosphäre über der Reaktionslösung mit Sauerstoff gesättigt. Die tiefblaue Lösung wurde weitere 3 h bei Raumtemperatur gerührt und der Reaktionsverlauf mittels DC überprüft. Nach vollständiger Umsetzung der Edukte wurde das Reaktionsgemisch auf 50 mL gesättigte Ammoniumchlorid-Lösung gegossen, die organische Phase abgetrennt und zwei weitere Male mit gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden mit Dichlormethan gegenextrahiert und die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet. Das Trocknungsmittel wurde abgetrennt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt. Die drei entstandenen Dimere wurden säulenchromatographisch getrennt (1. *n*-Hexan : Ethylacetat = 1:4, 2. Dichlormethan : Aceton = 1:1). Es konnten 0.068 g (0.057 mmol) des gewünschten Dimers **189** in Form eines farblosen, feinkristallinen Feststoffs isoliert werden.

Analytik:

Ausbeute: 49 %. **R_F:** 0.23 (Dichlormethan : Aceton = 1:1). **¹H-NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ = 0.63 (s, 3H, H-19), 0.65 (s, 3H, H-19'), 0.90 (s, 3H, H-18), 0.92 (d, $^3J_{HH}$ = 6.31 Hz, 6H, H-22, H-22'), 0.95 (s, 3H, H-18'), 0.98-1.06 (m, 2H, H-6, H-6'), 1.08-1.28 (m, 16H, H-7, H-7', H-8, H-8', H-11, H-11', H-13, H-13', H-14, H-14', H-15, H-15', H-16, H-16', H-17, H-17'), 1.31-1.50 (m, 16H, H-1, H-1', H-4, H-4', H-8, H-8', H-9, H-9', H-10, H-10', H-14, H-14', H-23, H-23'), 1.52-1.55 (m, 2H, H-3, H-3'), 1.55-1.61 (m, 2H, H-15, H-15'), 1.67-1.70 (m, 2H, H-1, H-1'), 1.74-1.96 (m, 10H, H-3, H-3', H-6, H-6', H-7, H-7', H-16, H-16', H-21, H-21'), 1.98-2.04 (m, 2H, H-13, H-13'), 2.18-2.28 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.28-2.42 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.47-2.70 (bs, 1H, H-20), 2.96 (s, 2H, H-31, H-31'), 3.05 (s, 4H, H-31, H-31'), 3.19 (d, $^2J_{PH}$ = 21.8 Hz, 4H, H-38), 3.49-3.67 (m, 1H, H-2'), 3.68 (d, $^2J_{PH}$ = 10.8 Hz, 12H, H-41), 4.09 (m, 1.1H, H-28, H-28'), 4.28 (m, 2.9H, H-28, H-28'), 4.87-5.01 (m, 1H, H-2'), 7.45 (bs, 1H, H-37), 7.84 (d, $^4J_{HH}$ = 2.0 Hz, 2H, H-35). **¹³C-NMR** (75.4 MHz, CDCl₃): δ = 12.2 (C19, C19'), 18.6 (C22), 18.7 (C22'), 20.9 (C14), 21.0 (C14'), 23.4 (C18), 23.5 (C18'), 24.4 (C15, C15'), 26.4 (C8), 26.5 (C8'), 27.2 (C7), 27.3 (C7'), 28.4 (C16, C16'), 29.4 (C24, C24'), 29.8 (C24'), 30.4 (C1), 30.7 (C1'), 31.1 (C23, C23'), 32.4 (C23, C23'), 33.3 (C31, C31'), 33.6 (d, $^2J_{PC}$ = 115.3 Hz, C38), 34.7 (C6, C6'), 34.8 (C31, C31'), 35.2 (C21, C21'), 35.5 (C5, C5'), 36.0 (C9, C9'), 36.6 (C28), 37.0 (C28'), 39.6 (C3, C3'), 40.8 (C28, C28'), 40.9 (C13, C13'), 42.1 (C10, C10'), 42.2 (C4, C4'), 42.9 (C12, C12'), 53.2 (d, $^2J_{PC}$ = 6.1 Hz, C42), 56.1 (C17, C17'), 56.6 (C11, C11'), 69.4 (C30, C30'), 69.6 (C30, C30'), 71.9 (C2, C2'), 73.8 (C29, C29'), 75.5 (C29, C29'), 129.7 (C36), 131.9 (C34), 132.2 (C37), 135.3 (C35), 165.6 (C32), 173.4 (C25, C25'). **³¹P-NMR** (121.5 MHz, CDCl₃): δ = 28.1. **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für C₆₉H₁₀₆N₂O₁₁P₂Na: m/z 1223.7164, gef.: m/z 1223.7298.

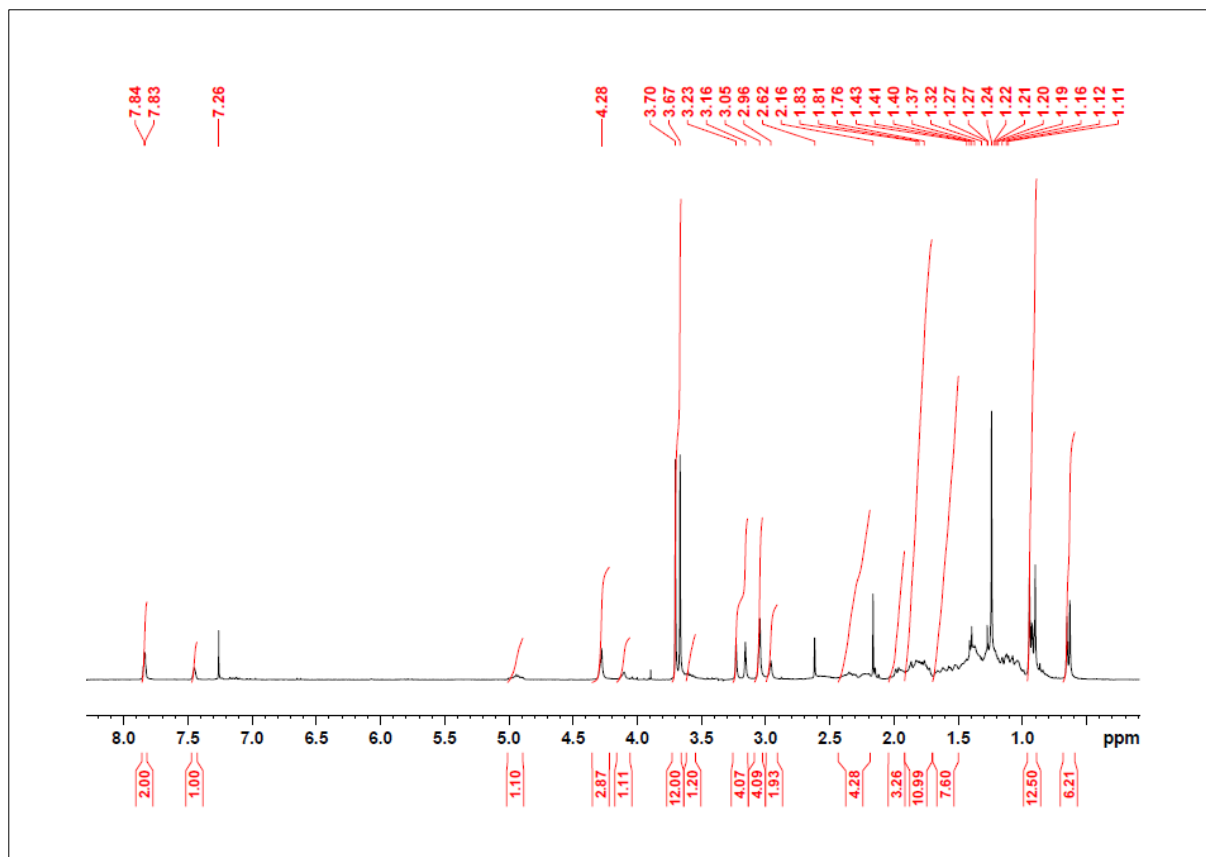


Abbildung 313: ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): BP-(lithocholsäure-N-methylpropargylamid-Dimer)-OH 189.

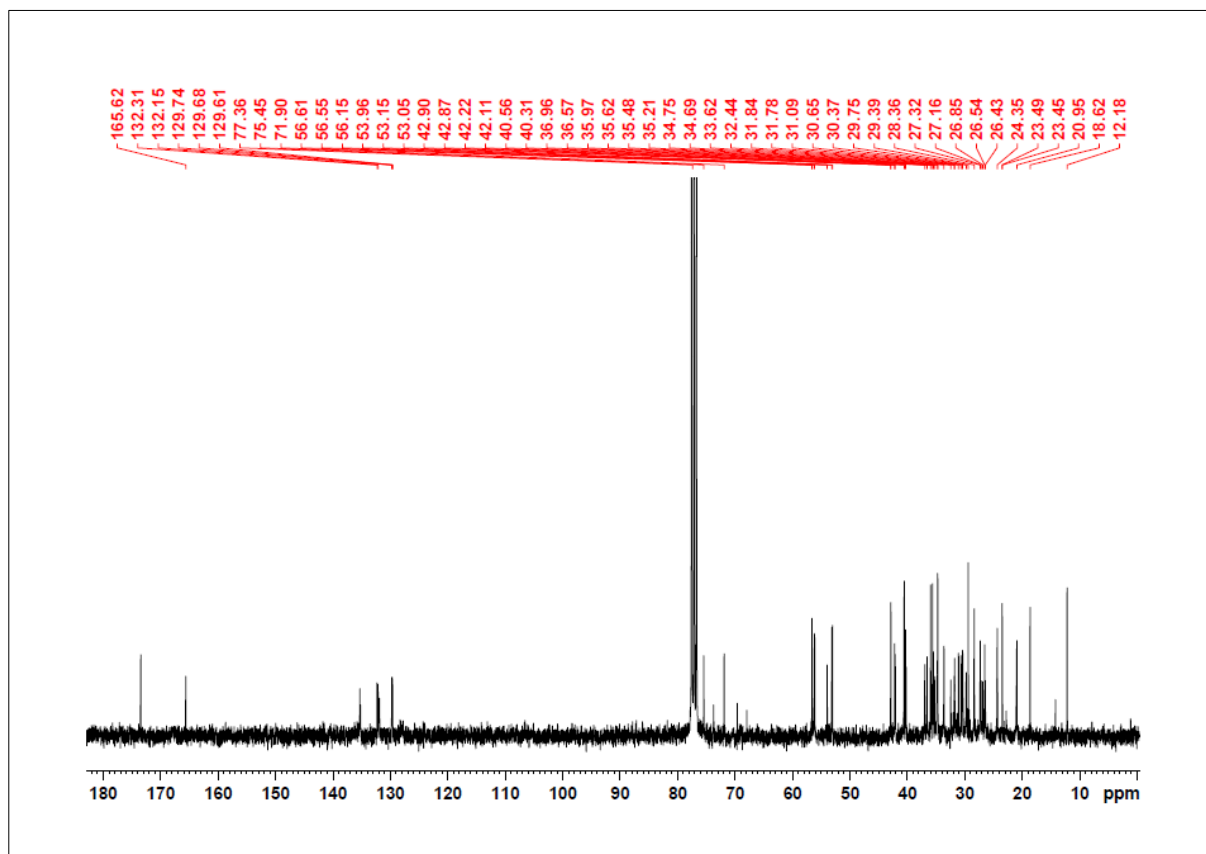
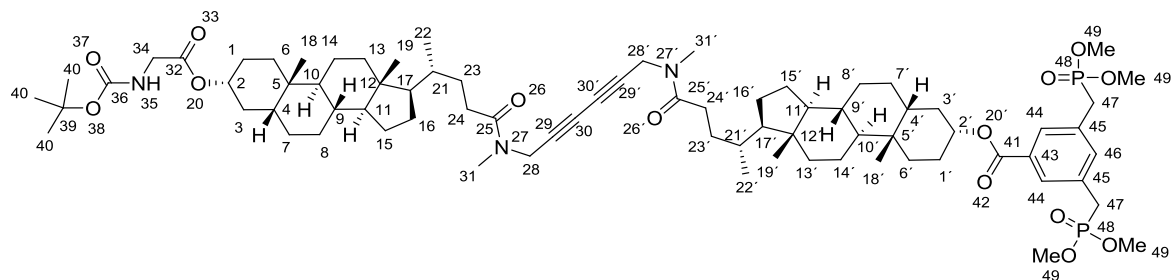


Abbildung 314: ¹³C-NMR (75.4 MHz, CDCl₃): BP-(lithocholsäure-N-methylpropargylamid-Dimer)-OH 189.

5.3.1.8 *N*-Boc-glycin-(lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-BP 77Ansatz:

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
72 (5.3.1.2)	584.83	2.0	0.175	0.100	
75 (5.3.1.5)	775.89	1.0	0.087	0.067	
CuCl	99.00	4.0	0.700	0.069	
TMEDA	116.20	4.0	0.700	0.081	0.106
CH ₂ Cl ₂					15.0

Durchführung:

0.1 g *N*-Boc-glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid **72** (0.175 mmol, 2 eq.) und 0.067 g BP-Lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid **75** (0.087 mmol, 1 eq.) wurden in 15 mL absolutem Dichlormethan gelöst. Zu dieser Lösung wurden 0.069 g Kupfer(I)chlorid (0.7 mmol, 4 eq.) und 0.106 mL *N,N,N',N'*-Tetramethylethylendiamin (0.081 g, 0.7 mmol, 4 eq.) zugegeben. Es wurde solange bei Raumtemperatur gerührt, bis das Kupfer(I)chlorid vollständig in Lösung gegangen war. Hierbei färbte sich die Lösung hellgrün. Danach wurde die Atmosphäre über der Reaktionslösung mit Sauerstoff gesättigt. Die tiefblaue Lösung wurde weitere 3 h bei Raumtemperatur gerührt und der Reaktionsverlauf mittels DC überprüft. Nach vollständiger Umsetzung der Edukte wurde das Reaktionsgemisch auf 50 mL gesättigte Ammoniumchlorid-Lösung gegossen, die organische Phase abgetrennt und zwei weitere Male mit gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden mit Dichlormethan gegenextrahiert und die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet. Das Trocknungsmittel wurde abgetrennt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt. Die drei entstandenen Dimere wurden säulenchromatographisch getrennt (Dichlormethan : Methanol = 30:1). Es konnten 0.06 g (0.044 mmol) des gewünschten Dimers **77** in Form eines farblosen, feinkristallinen Feststoffs isoliert werden.

Bei einer nichtvollständigen Umsetzung der Edukte **72** und **75**, werden zuerst das Edukt **72** und das Homodimer **87** säulenchromatographisch abgetrennt (*n*-Hexan : Ethylacetat = 2:1). Die Dimere **77** und **89** werden anschließend durch Umstellung der mobilen Phase (Dichlormethan : Aceton = 1:1) voneinander getrennt.

Analytik:

Ausbeute: 60.5 % (bezogen auf **75**). **R_F**: 0.21 (Dichlormethan : Methanol = 19:1). **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ = 0.64-0.65 (m, 6H, H-19, H-19'), 0.92-0.96 (m, 12H, H-18, H-18', H-22, H-22'), 0.97-2.01 (m, 52H), 1.45 (s, 9H, H-40), 2.17-2.28 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.30-2.41 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.94 (m, 2H, H-31, H-31'), 3.06 (m, 4H, H-31, H-31'), 3.20 (d, ²J_{PH} = 21.9 Hz, 4H, H-47), 3.69 (dd, ⁵J_{HH} = 0.79 Hz, ³J_{PH} = 10.83 Hz, 12H, H-49), 3.86 (d, ³J_{HH} = 5.24 Hz, 2H, H-34), 4.11 (m, 1.2H, H-28, H-28'), 4.29 (m, 2.8H, H-28, H-28'), 4.75-4.81 (m, 1H, H-2), 4.91-4.98 (m, 1H, H-2'), 5.01 (m, 1H, H-35), 7.45 (s, 1H, H-46), 7.84 (dd, ⁴J_{HH} = 2.41 Hz, ³J_{HH} = 4.22 Hz, 2H, H-44). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, CDCl₃): δ = 12.2 (C19, C19'), 18.6/18.7 (C22, C22'), 21.0 (C14, C14'), 23.4/23.5 (C18, C18'), 24.3 (C15, C15'), 26.4 (C8, C8'), 26.7/26.8 (C7, C7'), 27.1/27.2 (C16, C16'), 28.5 (C40), 30.3/30.4/30.5/31.1/31.4/32.2/32.3/32.4/33.3 (C24, C24', C23, C23', C1, C1', C47), 33.7 (C31, C31'), 34.7 (C5, C5'), 34.8 (C31, C31'), 35.1/35.2 (C6, C6'), 35.7 (C21, C21'), 35.9 (C9, C9'), 37.0 (C3, C3'), 40.3 (C28, C28', C13, C13'), 40.6 (C10, C10'), 42.0/42.1 (C4, C4'), 42.8 (C34), 42.9 (C12, C12'), 53.1 (d, ²J_{PC} = 6.8 Hz, C49), 56.2 (C17, C17'), 56.6 (C11, C11'), 68.0 (C30, C30'), 73.8 (C29, C29'), 75.5/75.8 (C2, C2'), 80.0 (C39), 129.7 (C44), 131.9 (C43), 132.2 (C45), 135.3 (C46), 155.8 (C36), 165.7 (C41), 170.0 (C32), 173.5 (C25, C25'). **³¹P-NMR** (121.5 MHz, CDCl₃): δ = 28.1. **IR** (ATR): $\tilde{\nu}$ = 2931 (w), 2863 (w), 2358 (w), 2037 (w), 1985 (w), 1713 (m), 1651 (m), 1055 (w), 1450 (m), 1391 (w), 1364 (w), 1324 (w), 1248 (m), 1206 (s), 1163 (s), 1115 (m), 1054 (s), 1027 (s), 986 (m), 901 (w), 853 (w), 806 (m), 771 (w), 724 (w), 693 (w). **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für C₇₆H₁₁₈N₃O₁₄P₂: m/z 1358.8084, gef.: m/z 1358.8001; ber. für C₇₆H₁₁₇N₃O₁₄P₂Na: m/z 1380.7903, gef.: m/z 1380.7985; ber. für (C₇₆H₁₁₇N₃O₁₄P₂)₂Na: m/z 2739.5947, gef.: m/z 2739.6234; ber. für (C₇₆H₁₁₇N₃O₁₄P₂)₃Na₂: m/z 2060.6941, gef.: m/z 2060.7001.

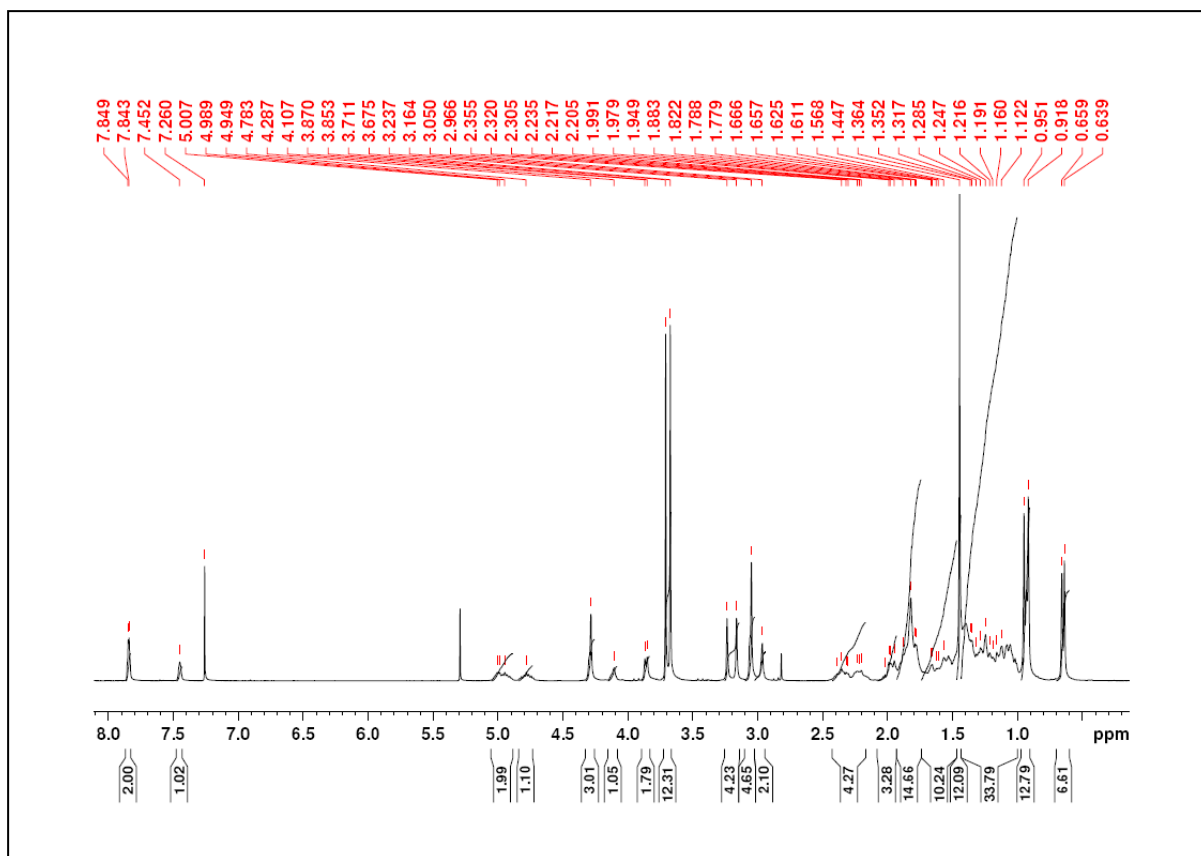


Abbildung 315: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): *N*-Boc-glycin-(lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-BP 77.

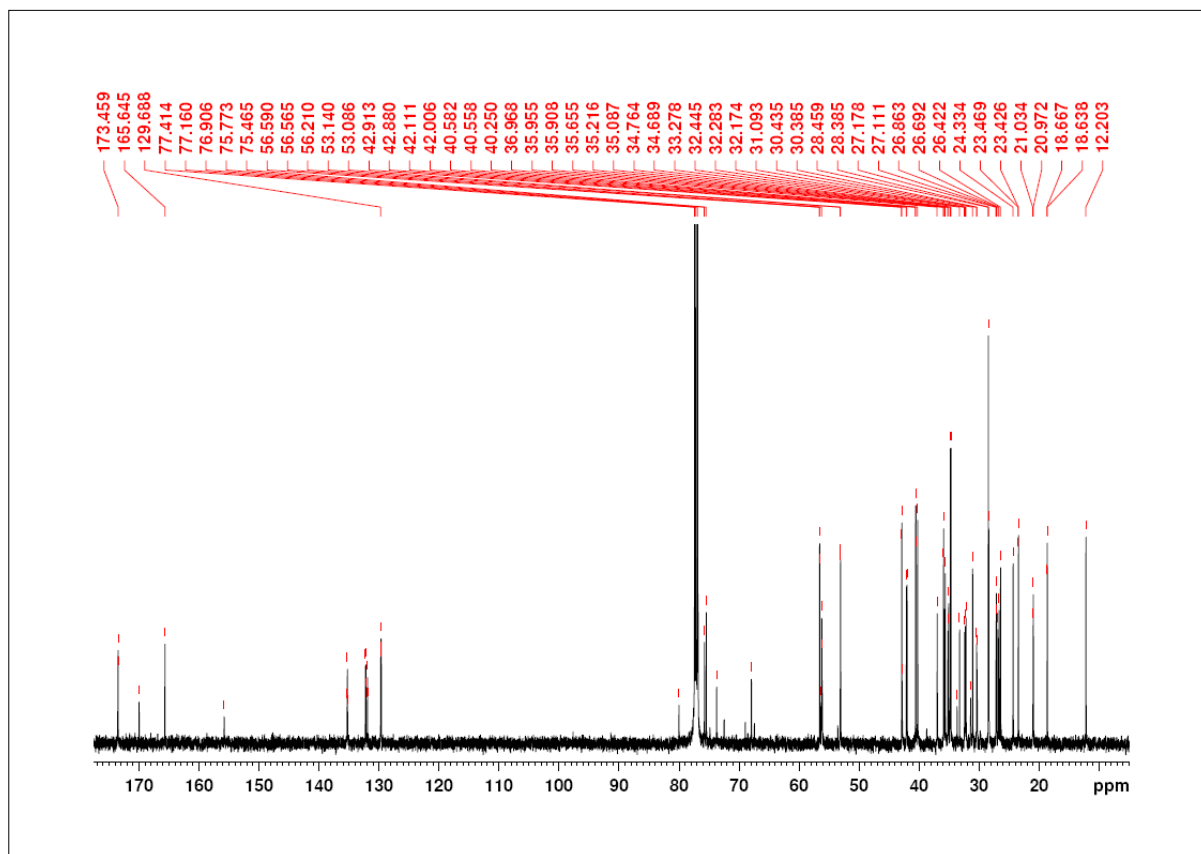
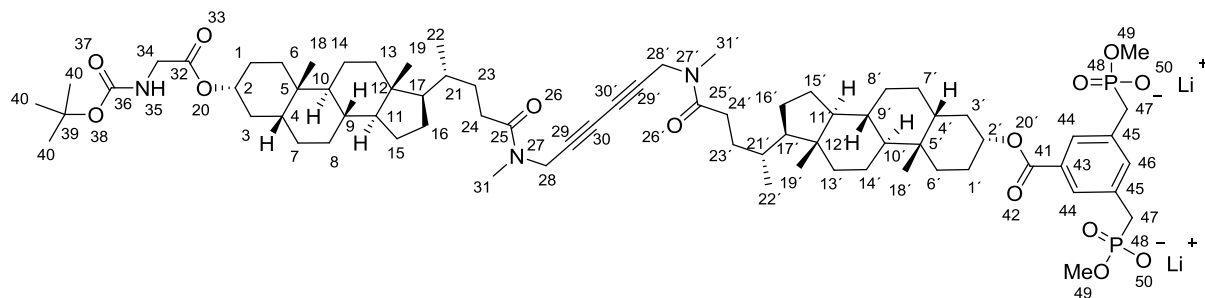


Abbildung 316: ¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃): *N*-Boc-glycin-(lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-BP 77.

5.3.1.9 *N*-Boc-glycin-(lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-BP(OLi)₂ 78



Ansatz:

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
77 (5.3.1.8)	1358.70	1.0	0.015	0.02	
LiBr	86.84	4.4	0.065	0.006	
CH ₃ CN					10.0

Durchführung:

0.02 g *N*-Boc-glycin-(lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-BP 77 (0.015 mmol, 1 eq.) wurden in 10 mL Acetonitril gelöst und mit 0.006 g trockenem LiBr (0.065 mmol, 4.4 eq.) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 48 h unter Rückfluss erhitzt. Dabei fiel das Produkt als farbloser Feststoff aus. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels DC überprüft. Nach vollständiger Umsetzung des Edukts wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur gekühlt und der Feststoff samt Reaktionslösung in ein Zentrifugenglas überführt. Der erhaltene Feststoff wurde abgetrennt und vier Mal mit je 10 mL Acetonitril gewaschen. Das farblose Produkt 0.018 g (0.014 mmol) wurde gründlich im Hochvakuum getrocknet.

Analytik:

Ausbeute: 98 %. **Schmp.:** > 300 °C **¹H-NMR** (300 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄ = 5:1): δ = 0.49 (s, 3H, H-19), 0.50 (s, 3H, H-19'), 0.76-0.80 (m, 12H, H-18, H-18', H-22, H-22'), 0.84-1.92 (m, 52H), 1.28 (s, 9H, H-40), 2.00-2.15 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.15-2.33 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.79 (m, 2H, H-31, H-31'), 2.91 (d, ²*J*_{PH} = 21.9 Hz, 4H, H-47), 2.93 (m, 4H, H-31, H-31'), 3.39 (d, ³*J*_{PH} = 10.83 Hz, 6H, H-49), 3.66 (s, 2H, H-34), 4.01 (s, 1.2H, H-28, H-28'), 4.11 (s, 2.8H, H-28, H-28'), 4.53-4.68 (m, 1H, H-2), 4.68-4.85 (m, 1H, H-2'), 7.44 (s, 1H, H-46), 7.53 (s, 2H, H-44). **¹³C-NMR** (75.4 MHz, MeOD-*d*₄): δ = 12.8 (C19, C19'), 19.2 (C22, C22'), 22.2 (C14, C14'), 24.0 (C18, C18'), 24.1 (C15, C15'), 25.5 (C8, C8'), 27.7 (C7, C7'), 28.2 (C16, C16'), 29.5 (C40), 31.4/31.5/31.6/32.6/32.7/33.6/33.7/34.3/34.4 (C24, C24', C23, C23', C1, C1', C47), 33.4 (C31, C31'), 33.7 (C5, C5'), 35.8 (C31, C31'), 35.9/36.1 (C6, C6'), 36.3 (C21, C21'), 37.0 (C9, C9'), 37.3 (C3, C3'), 37.4 (C28, C28', C13, C13'), 41.4 (C10, C10'), 42.0/42.1 (C4, C4'), 43.4 (C34), 44.1 (C12, C12'), 53.9 (d, ²*J*_{PC} = 6.4 Hz, C49), 57.7 (C17, C17'), 58.1 (C11, C11'), 68.2 (C30, C30'), 73.4 (C29, C29'), 75.1/76.9 (C2, C2'), 78.3 (C39), 129.5 (C44), 130.7 (C43), 133.8 (C45), 137.3 (C46), 154.9 (C36), 166.7 (C41), 168.1 (C32), 175.9 (C25, C25'). **³¹P-NMR** (121.5 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄ = 5:1): δ = 22.01. **HRMS** (ESI neg., MeOH): ber. für C₇₄H₁₁₂N₃O₁₄P₂: m/z 1328.7625, m/z 663.8776, gef.: m/z 1328.7642, m/z 663.8763. (ESI pos., MeOH): ber. für C₇₄H₁₁₃N₃O₁₄P₂Na: m/z 1352.7590, gef.: m/z 1352.7420.

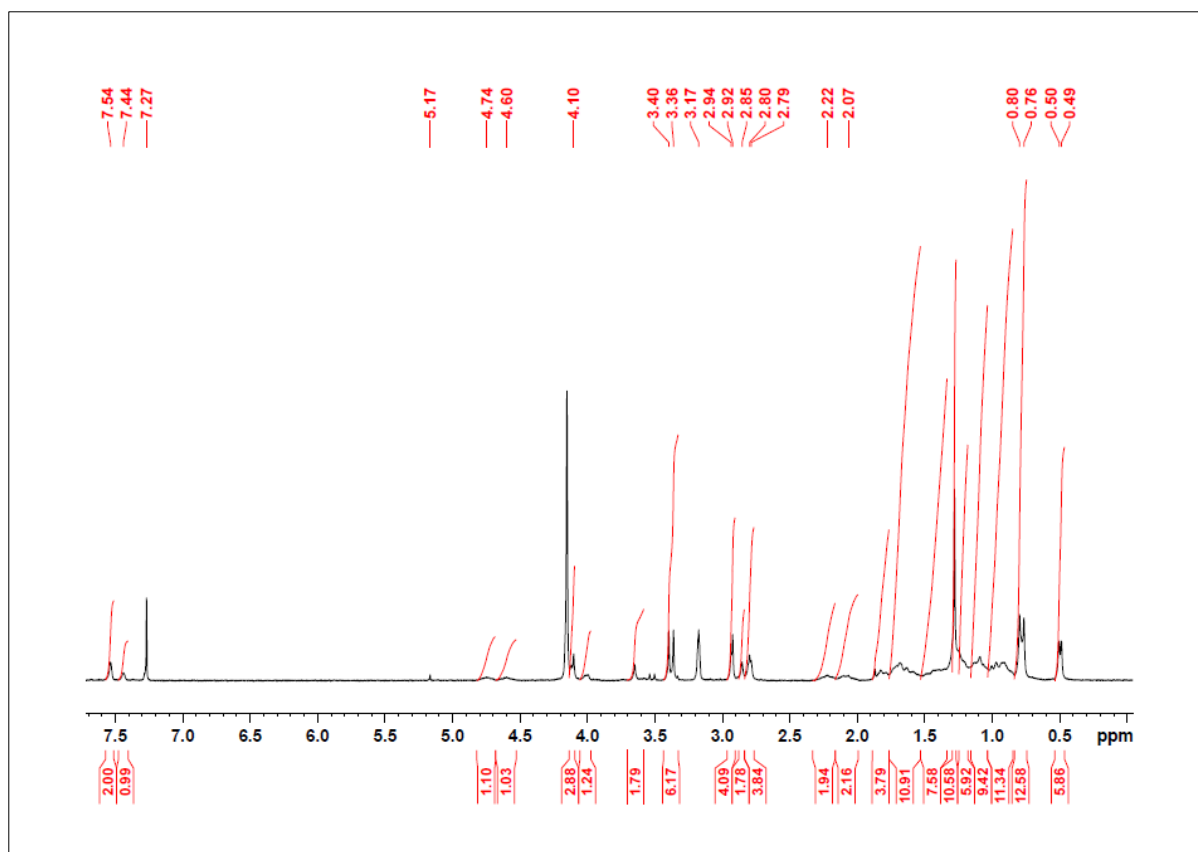


Abbildung 317: ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄ = 5:1): *N*-Boc-glycin-(lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-BP(OLi)₂ 78.

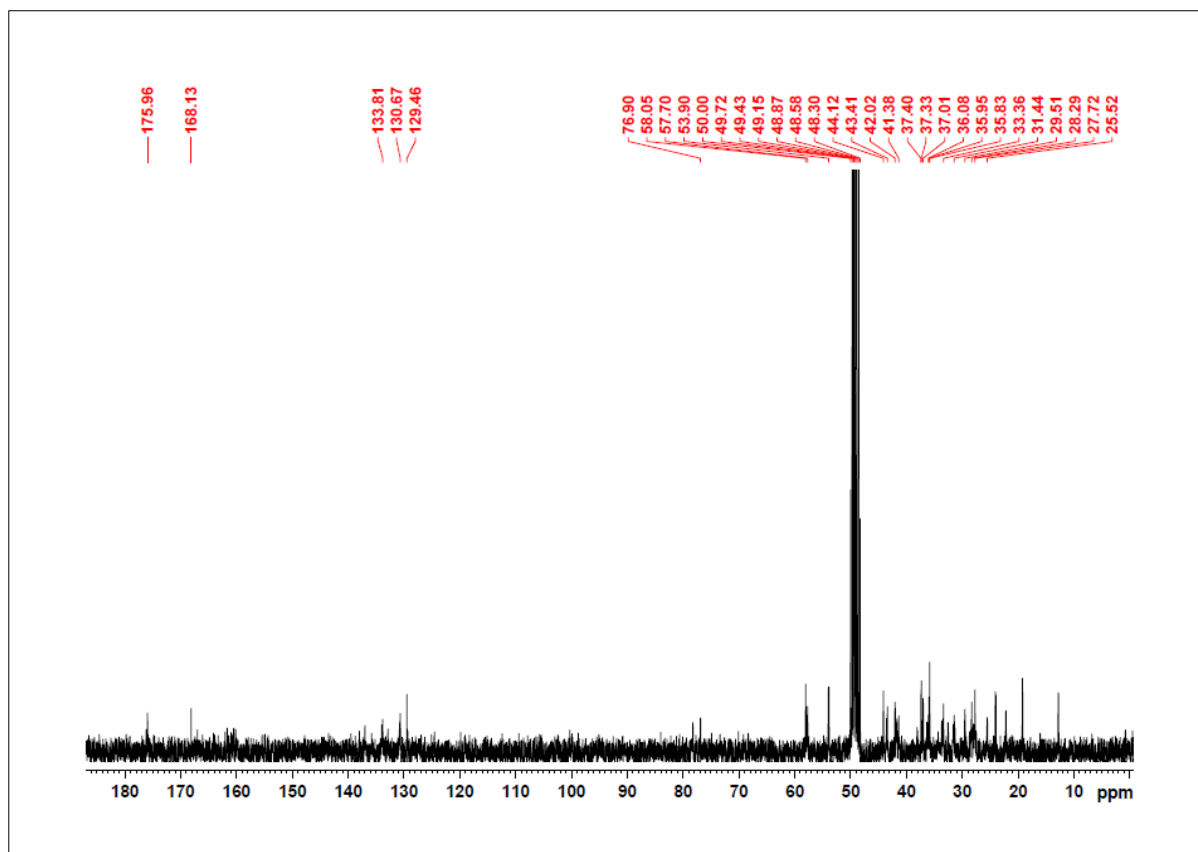
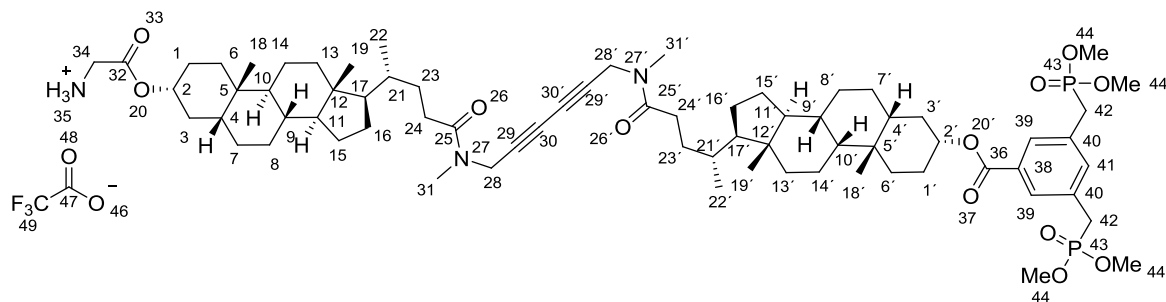


Abbildung 318: ¹³C-NMR (75.4 MHz, MeOD-*d*₄): *N*-Boc-glycin-(lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-BP(OLi)₂ 78.

5.3.1.10 Trifluoracetat-glycin-(lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-BP 65Ansatz:

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
77 (5.3.1.8)	1358.70	1.0	0.037	0.05	
TFA					2.0
CH ₂ Cl ₂					10.0
Benzol					40.0

Durchführung:

0.05 g *N*-Boc-glycin-(lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-BP 77 (0.037 mmol, 1 eq.) wurden in 10 mL Dichlormethan gelöst und mit 2 mL Trifluoressigsäure versetzt. Die Reaktionslösung wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt, der Reaktionsfortschritt mittels DC überprüft. Die Lösung wurde mit 10 mL Benzol verdünnt und anschließend am Rotationsverdampfer auf 2 mL eingengt. Das so erhaltene Konzentrat wurde dreimal mit je 10 mL Benzol aufgenommen und wiederum eingengt, um die überschüssige Trifluoressigsäure im azeotropen Gemisch vollständig zu entfernen. Das Produkt wurde 48 h am Ölpumpenvakuum getrocknet. Es konnten 0.051 g (0.037 mmol) eines farblosen, hochviskosen Öls erhalten werden.

Analytik:

Ausbeute: 99 %. **R_F:** 0.43 (Dichlormethan : Methanol = 9:1). **Schmp.:** >300 °C. **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄ = 1:1): δ = 0.69 (s, 3H, H-19'), 0.71 (s, 3H, H-19), 0.96 (s, 6H, H-18, H-18'), 0.99-1.00 (m, 6H, H-22, H-22'), 1.01-1.99 (m, 52H), 2.22-2.37 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.37-2.53 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.94 (s, 2H, H-31, H-31'), 3.09 (s, 4H, H-31, H-31'), 3.34 (d, ²J_{PH} = 22.1 Hz, 4H, H-42), 3.71 (d, ³J_{PH} = 10.9 Hz, 12H, H-44), 3.78 (s, 2H, H-34), 4.1-4.37 (m, 4H, H-28, H-28'), 4.78-4.87 (m, 1H, H-2'), 4.87-4.98 (m, 1H, H-2), 7.51 (s, 1H, H-41), 7.87 (s, 2H, H-39). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, MeOD-*d*₄): δ = 12.7 (C19, C19'), 19.2/19.3 (C22, C22'), 22.1 (C14, C14'), 23.8/23.9 (C18, C18'), 24.2 (C15, C15'), 26.2 (C8, C8'), 26.7/26.8 (C7, C7'), 27.1/27.2 (C16, C16'), 30.3/30.4/30.5/31.1/31.4/32.2/32.3/32.4/ 33.3 (C24, C24', C23, C23', C1, C1', C42), 33.7 (C31, C31'), 34.7 (C5, C5'), 34.8 (C31, C31'), 35.1/35.2 (C6, C6'), 35.7 (C21, C21'), 35.9 (C9, C9'), 37.0 (C3, C3'), 40.3 (C28, C28', C13, C13'), 40.5 (C34), 40.6 (C10, C10'), 42.0/42.1 (C4, C4'), 42.9 (C12, C12'), 53.8 (d, ²J_{PC} = 6.8 Hz, C44), 56.2 (C17, C17'), 56.6 (C11, C11'), 68.0 (C30, C30'), 73.8 (C29, C29'), 76.9/78.3 (C2, C2'), 129.5 (C39), 130.6 (C38), 133.8 (C40), 138.8 (C41), 168.1 (C36), 170.0 (C32), 173.9 (C25, C25'), 176.3 (C25, C25'). **³¹P-NMR** (121.5 MHz, MeOD-*d*₄): δ = 28.03. **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für C₇₁H₁₁₀N₃O₁₂P₂: m/z 1258.7559, gef.: m/z 1258.7702.

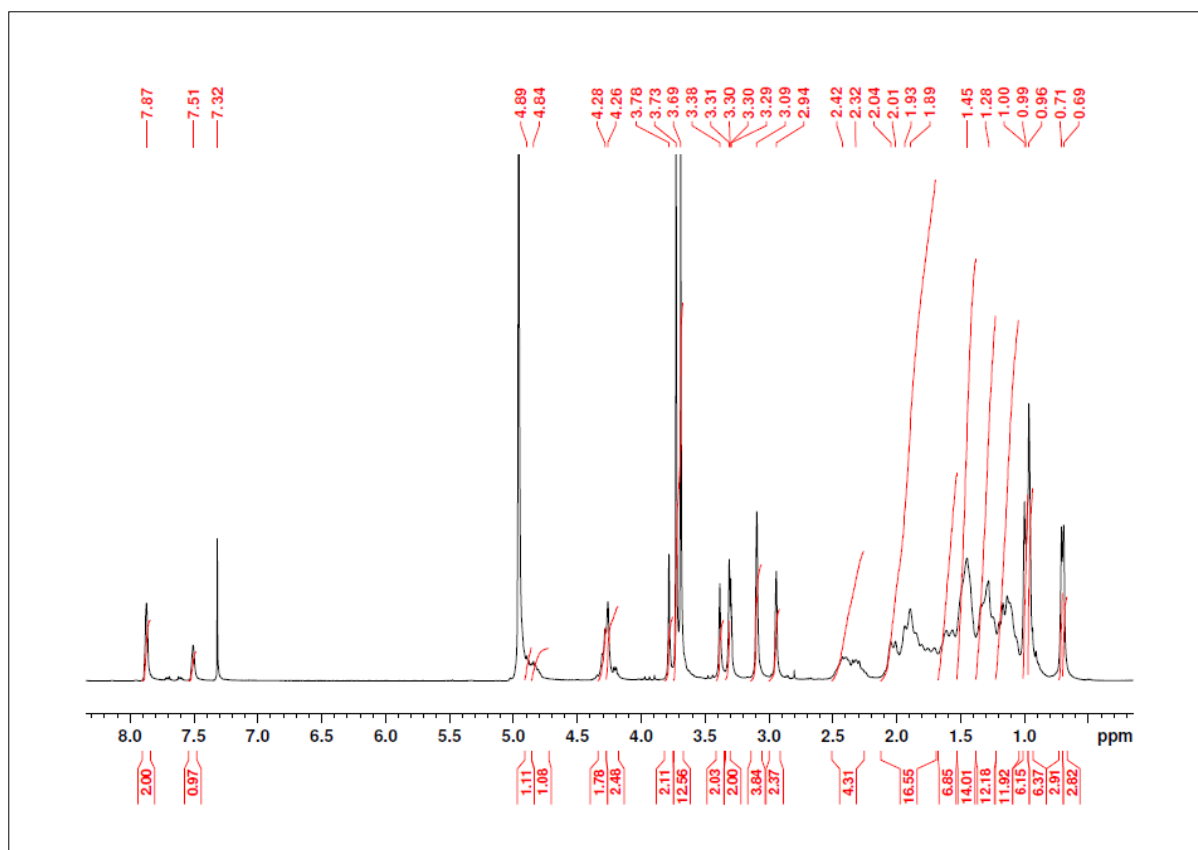


Abbildung 319: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄ = 1:1): Trifluoracetat-glycin-(lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-BP 65.

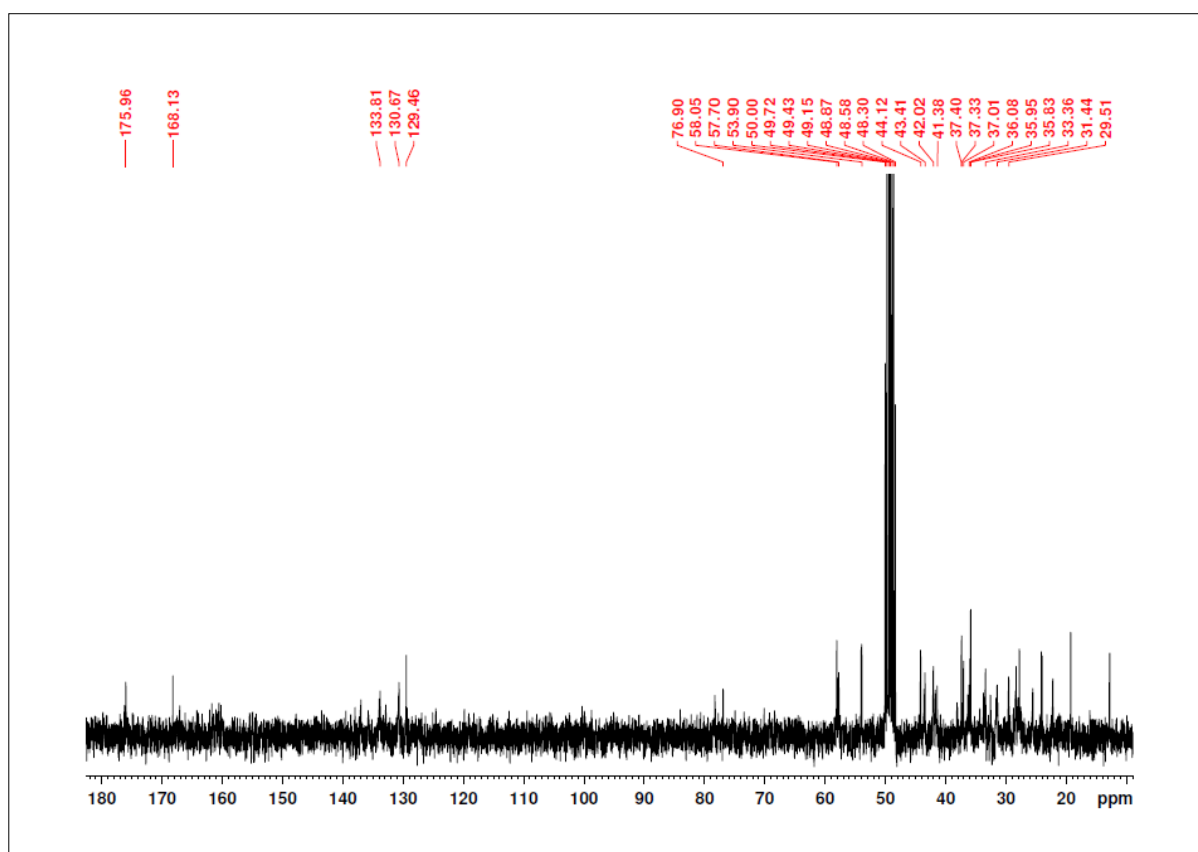
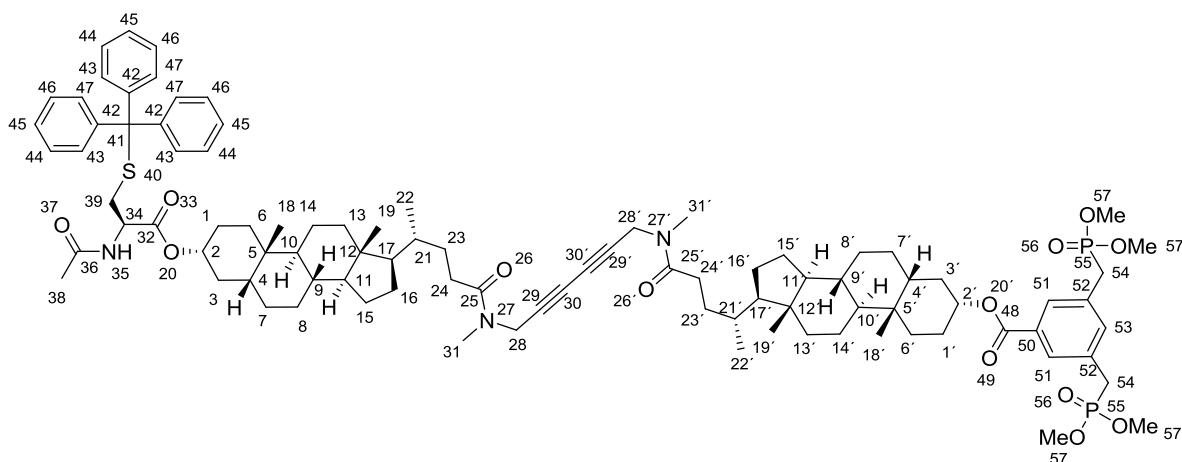


Abbildung 320: ¹³C-NMR (125.7 MHz, MeOD-*d*₄): Trifluoracetat-glycin-(lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-BP 65.

5.3.1.11 *N*-Acetyl-cystein-(*S*-trityl)-(lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-BP 143



Ansatz:

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
140 (5.3.1.4)	803.47	1.0	0.307	0.250	
75 (5.3.1.5)	762.86	0.5	0.153	0.117	
CuCl	99.00	10.0	3.067	0.304	
TMEDA	116.20	10.0	3.067	0.356	0.463
CH ₂ Cl ₂					15.0

Durchführung:

0.25 g *N*-Acetyl-cystein-(*S*-trityl)-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid **140** (0.307 mmol, 1 eq.) und 0.117 g BP-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid **75** (0.153 mmol, 0.5 eq.) wurden in 15 mL Dichlormethan gelöst. Zu dieser Lösung wurden 0.304 g Kupfer(I)chlorid (3.067 mmol, 10 eq.) und 0.463 mL *N,N,N',N'*-Tetramethylethylendiamin (0.356 g, 3.067 mmol, 10 eq.) zugegeben. Es wurde solange bei Raumtemperatur gerührt, bis das Kupfer(I)chlorid vollständig in Lösung gegangen war. Hierbei färbte sich die Lösung hellgrün. Danach wurde die Atmosphäre über der Reaktionslösung mit Sauerstoff gesättigt. Die tiefblaue Lösung wurde weitere 5 h bei Raumtemperatur gerührt und der Reaktionsverlauf mittels DC überprüft. Nach vollständiger Umsetzung der Edukte wurde das Reaktionsgemisch auf 50 mL gesättigte Ammoniumchlorid-Lösung gegossen, die organische Phase abgetrennt und zwei weitere Male mit gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden mit Dichlormethan gegenextrahiert und die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet. Das Trocknungsmittel wurde abgetrennt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt. Die drei entstandenen Dimere wurden säulenchromatographisch getrennt (*n*-Hexan : Ethylacetat = 1:1; nach Ab-

trennung des Dimers **197**: Dichlormethan : Methanol = 30:1). Es konnten 0.122 g (0.09 mmol) des gewünschten Dimers **143** in Form eines farblosen, feinkristallinen Feststoffs isoliert werden.

Analytik:

Ausbeute: 59 % (bezogen auf **75**). **R_F**: 0.22 (Dichlormethan : Methanol = 30:1). **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ = 0.65 (s, 6H, H-19, H-19'), 0.91 (s, 3H, H-18'), 0.93 (d, $^3J_{HH}$ = 6.15 Hz, 6H, H-22, H-22'), 0.94 (s, 3H, H-18), 0.97-1.04 (m, 2H, H-6, H-6'), 1.06-1.28 (m, 16H, H-7, H-7', H-8, H-8', H-11, H-11', H-13, H-13', H-14, H-14', H-15, H-15', H-16, H-16', H-17, H-17'), 1.30-1.48 (m, 16H, H-1, H-1', H-4, H-4', H-8, H-8', H-9, H-9', H-10, H-10', H-14, H-14', H-23, H-23'), 1.50-1.54 (m, 2H, H-3, H-3'), 1.56-1.60 (m, 2H, H-15, H-15'), 1.65-1.68 (m, 2H, H-1, H-1'), 1.74-1.92 (m, 10H, H-3, H-3', H-6, H-6', H-7, H-7', H-16, H-16', H-21, H-21'), 1.95-1.99 (m, 2H, H-13, H-13'), 1.94 (s, 3H, H-38), 2.16-2.28 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.31-2.42 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.50 (dd, $^2J_{HH}$ = 12.41 Hz, $^3J_{HH}$ = 4.57 Hz, 1H, H-39), 2.67 (ddd, $^2J_{HH}$ = 12.41 Hz, $^3J_{HH}$ = 4.57 Hz, $^3J_{HH}$ = 5.53 Hz, 1H, H-39), 2.96 (s, 2H, H-31, H-31'), 3.06 (s, 4H, H-31, H-31'), 3.19 (d, $^2J_{PH}$ = 21.8 Hz, 4H, H-54), 3.68 (d, $^2J_{PH}$ = 10.8 Hz, 12H, H-57), 4.11 (m, 1.4H, H-28, H-28'), 4.27 (m, 2.6H, H-28, H-28'), 4.56 (ddd, $^3J_{HH}$ = 5.53 Hz, $^3J_{HH}$ = 4.43 Hz, $^3J_{HH}$ = 7.61 Hz, 1H, H-34), 4.68-4.77 (m, 1H, H-2), 4.90-4.98 (m, 1H, H-2'), 5.99 (d, $^3J_{HH}$ = 7.61 Hz, 1H, H-35), 7.18-7.23 (m, 3H, H-45), 7.25-7.30 (m, 6H, H-44, H-46), 7.36-7.39 (m, 6H, H-43, H-47), 7.45 (bs, 1H, H-53), 7.84 (d, $^4J_{HH}$ = 2.65 Hz, 2H, H-51). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, CDCl₃): δ = 12.2 (C19, C19'), 18.6 (C22, C22'), 20.9 (C14'), 21.0 (C14), 23.2 (C38), 23.4 (C18'), 23.5 (C18), 24.3 (C15, C15'), 26.4 (C8'), 26.6 (C8), 26.7 (C7), 26.8 (C7'), 27.1 (C16), 27.2 (C16'), 28.4 (C24, C24'), 30.3 (C1, C1'), 30.4 (C24, C24'), 31.1 (C23, C23'), 32.9 (d, $^1J_{PC}$ = 115.3 Hz, C54), 33.2 (C31, C31'), 33.7 (C31, C31'), 34.2 (C6, C6'), 34.3 (C39), 34.7 (C21, C21'), 35.1 (C5, C5'), 35.6 (C9, C9'), 35.9 (C28, C28'), 36.9 (C3, C3'), 40.2 (C28, C28'), 40.3 (C13, C13'), 40.5 (C10, C10'), 41.8 (C4'), 42.2 (C4), 42.8 (C12, C12'), 51.3 (C34), 53.1 (d, $^2J_{PC}$ = 6.3 Hz, C57), 56.1 (C17'), 56.2 (C17), 56.5 (C11'), 56.6 (C11), 66.8 (C41), 67.2 (C30, C30'), 67.2 (C30, C30'), 69.3 (C29, C29'), 73.4 (C2, C2'), 78.2 (C29, C29'), 127.0 (C45), 128.1 (C43, C47), 129.4 (C51), 129.6 (C44, C46), 131.6 (C50), 131.9 (C52), 135.0 (C53), 144.4 (C42), 165.3 (C48), 169.6 (C36), 170.1 (C32), 173.2 (C25, C25'), 173.5 (C25, C25'). **³¹P-NMR** (121.5 MHz, CDCl₃): δ = 28.1. **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für C₉₃H₁₂₆N₃O₁₃P₂S: m/z 1587.8514, gef.: m/z 1587.8874; ber. für C₉₃H₁₂₄N₃O₁₃P₂SNa: m/z 1609.8334, gef.: m/z 1609.8411.

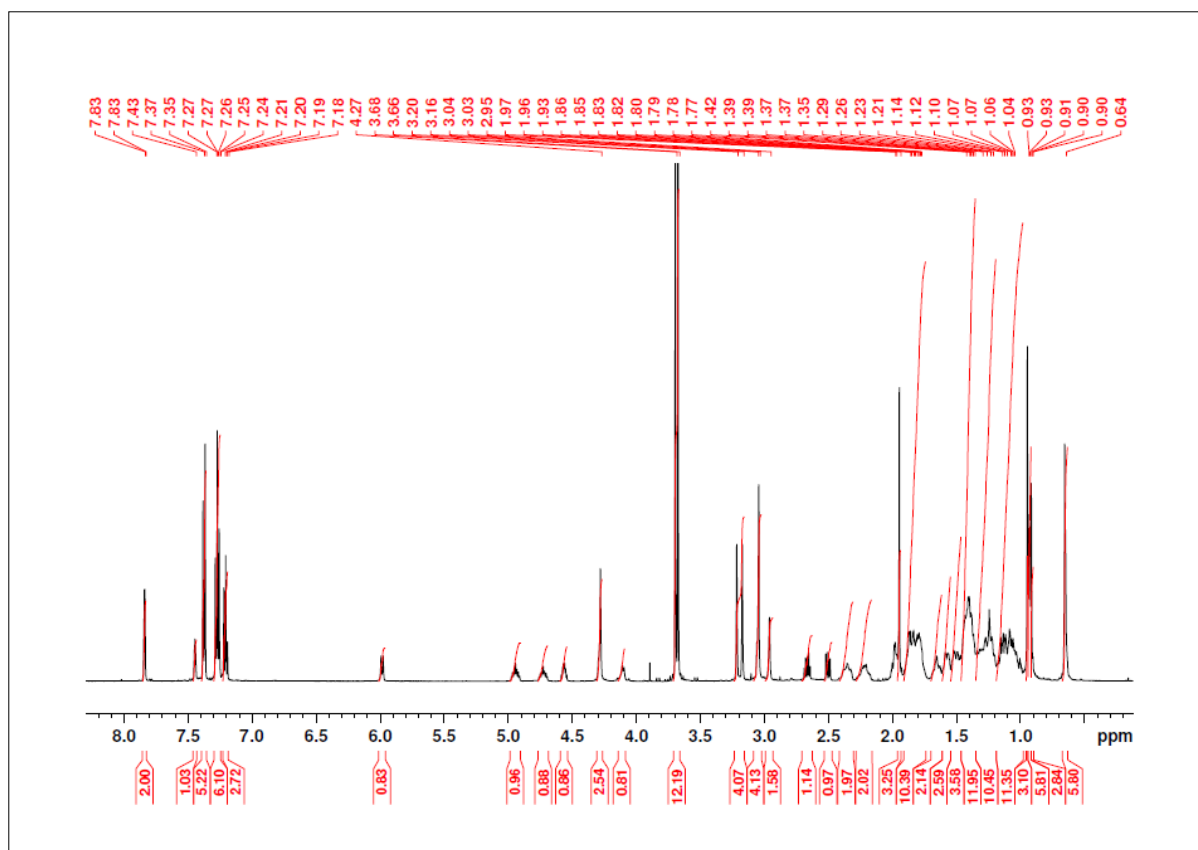


Abbildung 321: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): *N*-Acetyl-cystein-(*S*-trityl)-(lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-BP 143.

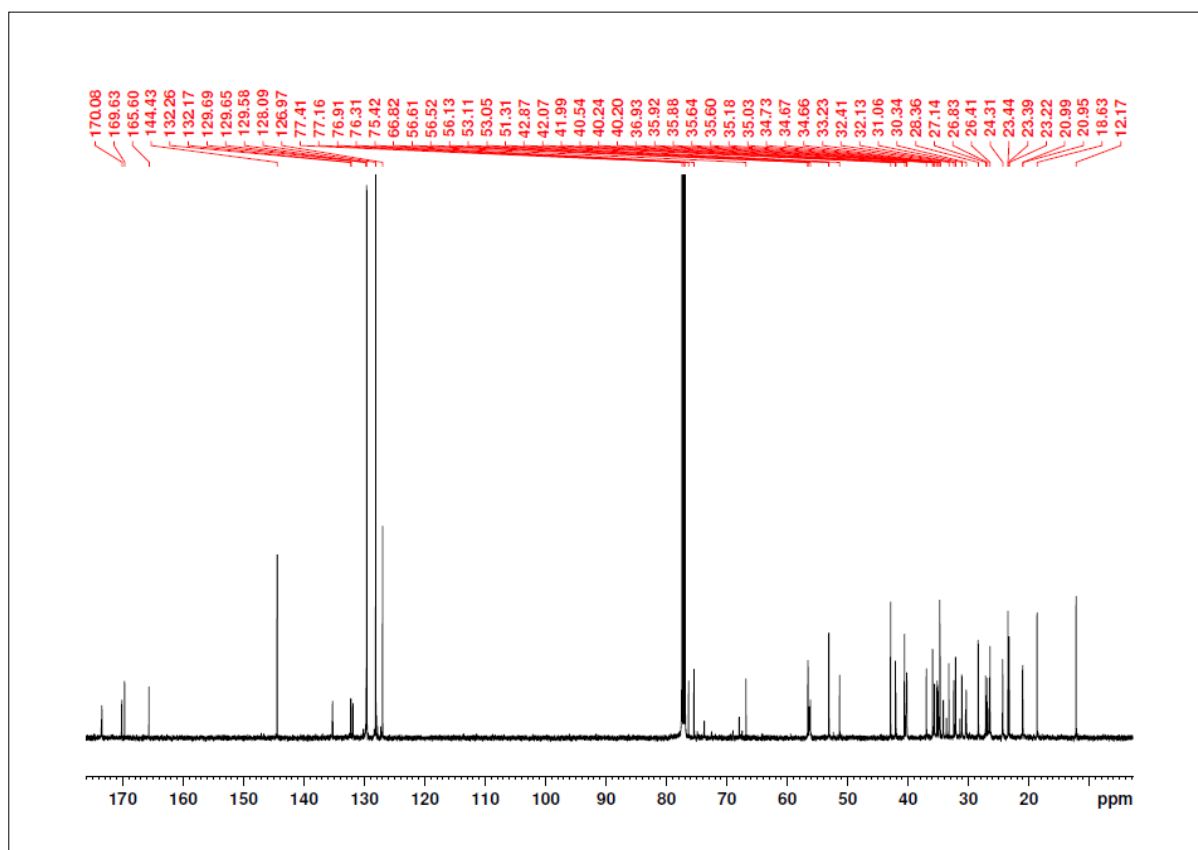
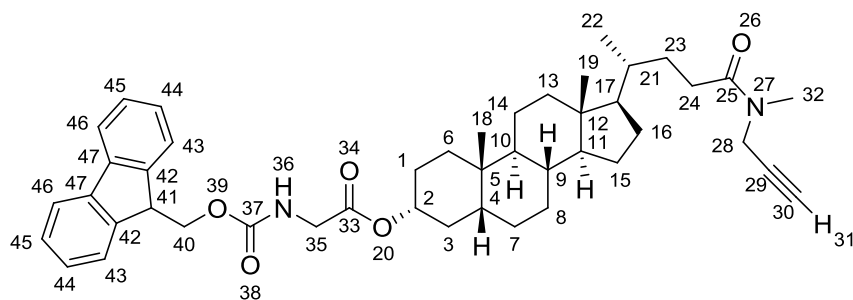


Abbildung 322: ¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃): *N*-Acetyl-cystein-(*S*-trityl)-(lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-BP 143.

5.3.1.12 *N*-Fmoc-glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid **103****Ansatz:**

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
<i>N</i> -Fmoc-glycin	297.31	1.2	2.81	0.75	
71 (5.3.1.1)	427.66	1.0	2.34	1.00	
HCTU	413.69	1.2	2.81	1.16	
Cl-HOBt	169.57	2.5	5.85	0.99	
DIEA	129.25	3.0	7.01	0.09	1.22
CH ₂ Cl ₂					10.0
DMF					5.0

Durchführung:

0.75 g *N*-Fmoc-glycin (2.81 mmol, 1.2 eq.) wurden in 15 mL eines 2:1 Gemisches aus Dichlormethan und *N,N'*-Dimethylformamid gelöst. Die Lösung wurde im Eisbad auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurden 1.16 g HCTU (2.81 mmol, 1.2 eq.) und 0.99 g Cl-HOBt (5.85 mmol, 2.5 eq.) zugegeben. Nachdem sich alle Komponenten gelöst hatten, wurde das Gemisch mit 1.22 mL DIEA (7.01 mmol, 3 eq.) versetzt und die Reaktionslösung für 10 min bei 0 °C gerührt. Nach Zugabe von 1.00 g Lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid (**71**) (2.34 mmol, 1 eq.) wurde die Reaktionslösung auf RT aufgetaut und für weitere 15 h gerührt. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels DC verfolgt. Die Lösung wurde mit 15 mL Dichlormethan verdünnt und mit jeweils 30 mL gesättigter NaHCO₃-Lösung und 1 M Salzsäure extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das gelbliche hochviskose Rohprodukt im Ölpumpenvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wurde anschließend säulenchromatographisch gereinigt (*n*-Hexan : Ethylacetat = 2:1). Es konnten 1.41 g (1.99 mmol) eines weißen, kristallinen Feststoffes erhalten werden.

Analytik:

Ausbeute: 85 %. **R_F:** 0.32 (*n*-Hexan : Ethylacetat = 2:1). **¹H-NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ = 0.63 (3H, H-19), 0.92 (m, 6H, H-18, H-22), 0.96-0.99 (m, 1H, H-6), 0.91-1.13 (m, 8H, H-7, H-8, H-11, H-13, H-14, H-15, H-16, H-17), 1.29-1.50 (m, 8H, H-1, H-3, H-4, H-8, H-9, H-10, H-14, H-23), 1.64-1.69 (m, 1H, H-15), 1.70-1.76 (m, 1H, H-1), 1.67-1.98 (m, 5H, H-3, H-6, H-7, H-16, H-21), 1.93-1.96 (m, 1H, H-13), 2.18 (t, $^4J_{HH} = 2.35$ Hz, 0.7H, H-31), 2.16-2.29 (m, 1H, H-24), 2.30 (t, $^4J_{HH} = 2.35$ Hz, 0.3H, H-31), 2.31-2.45 (m, 1H, H-24), 2.99 (s, 1H, H-32), 3.08 (s, 2H, H-32), 3.97 (d, $^3J_{HH} = 5.2$ Hz, 2H, H-35), 4.04 (d, $^4J_{HH} = 2.35$ Hz, 0.7H, H-28), 4.23 (d, $^4J_{HH} = 2.35$ Hz, 1.3H, H-28), 4.24 (t, $^3J_{HH} = 7.38$ Hz, 1H, H-41), 4.39 (d, $^3J_{HH} = 7.38$ Hz, 2H, H-40), 4.75-4.89 (m, 1H, H-2), 5.30 (t, $^3J_{HH} = 5.2$ Hz, 1H, H-35), 7.32 (dd, $^3J_{HH} = 7.4$ Hz, $^3J_{HH} = 7.4$ Hz, 2H, H-44), 7.41 (dd, $^3J_{HH} = 7.4$ Hz, $^3J_{HH} = 7.4$ Hz, 2H, H-45), 7.61 (d, $^3J_{HH} = 7.4$ Hz, 2H, H-43), 7.77 (d, $^3J_{HH} = 7.4$ Hz, 2H, H-46). **¹³C-NMR** (75.4 MHz, CDCl₃): δ = 12.3 (C19), 18.7 (C22), 21.0 (C14), 23.4 (C18), 24.3 (C15), 26.3 (C8), 26.7 (C7), 27.1 (C16), 28.3 (C24), 30.5 (C1), 31.1 (C24), 31.4 (C23), 32.3 (C23), 33.5 (C32), 34.5 (C32), 34.7 (C5), 35.1 (C6), 35.7 (C21, C9), 35.9 (C28), 36.3 (C3), 39.6 (C28), 40.3 (C13), 40.6 (C10), 42.0 (C4), 42.8 (C35), 42.9 (C12), 56.1 (C41), 56.3 (C17), 56.6 (C11), 67.3 (C40), 71.7 (C30), 72.8 (C30), 75.8 (C2), 78.4 (C29), 79.1 (C29), 120.1 (C45), 125.2 (C44), 127.1 (C46), 127.8 (C43), 156.4 (C37), 169.6 (C33), 173.5 (C25). **IR** (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3301 (w), 2932 (m), 2864 (m), 2162 (w), 2036 (w), 1980 (w), 1723 (s), 1642 (s), 1519 (m), 1468 (m), 1449 (m), 1396 (m), 1358 (m), 1256 (m), 1200 (s), 1106 (m), 1049 (m), 1005 (m), 945 (w), 759 (s), 740 (s). **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für: C₄₅H₅₈N₂O₅Na: m/z 729.4238, gef.: m/z 729.4289.

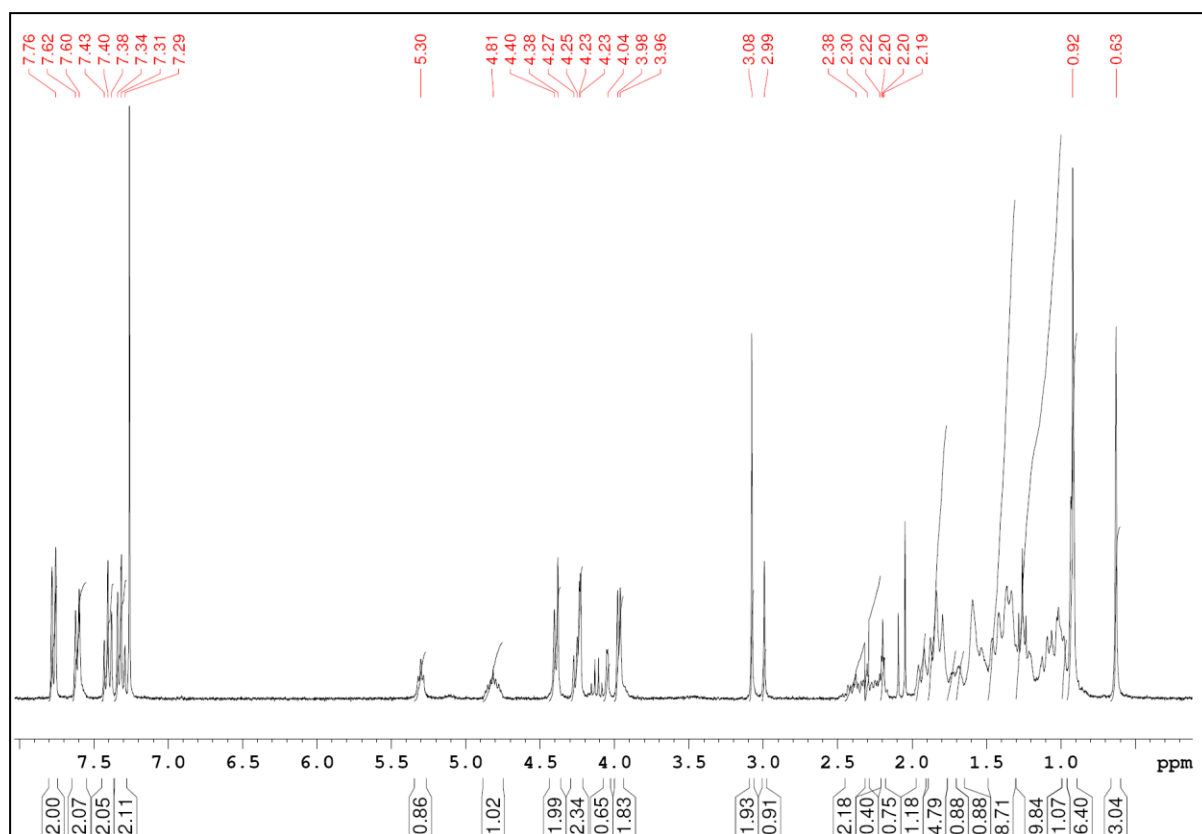


Abbildung 323: ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): N-Fmoc-glycin-lithocholsäure-N-methylpropargylamid 103.

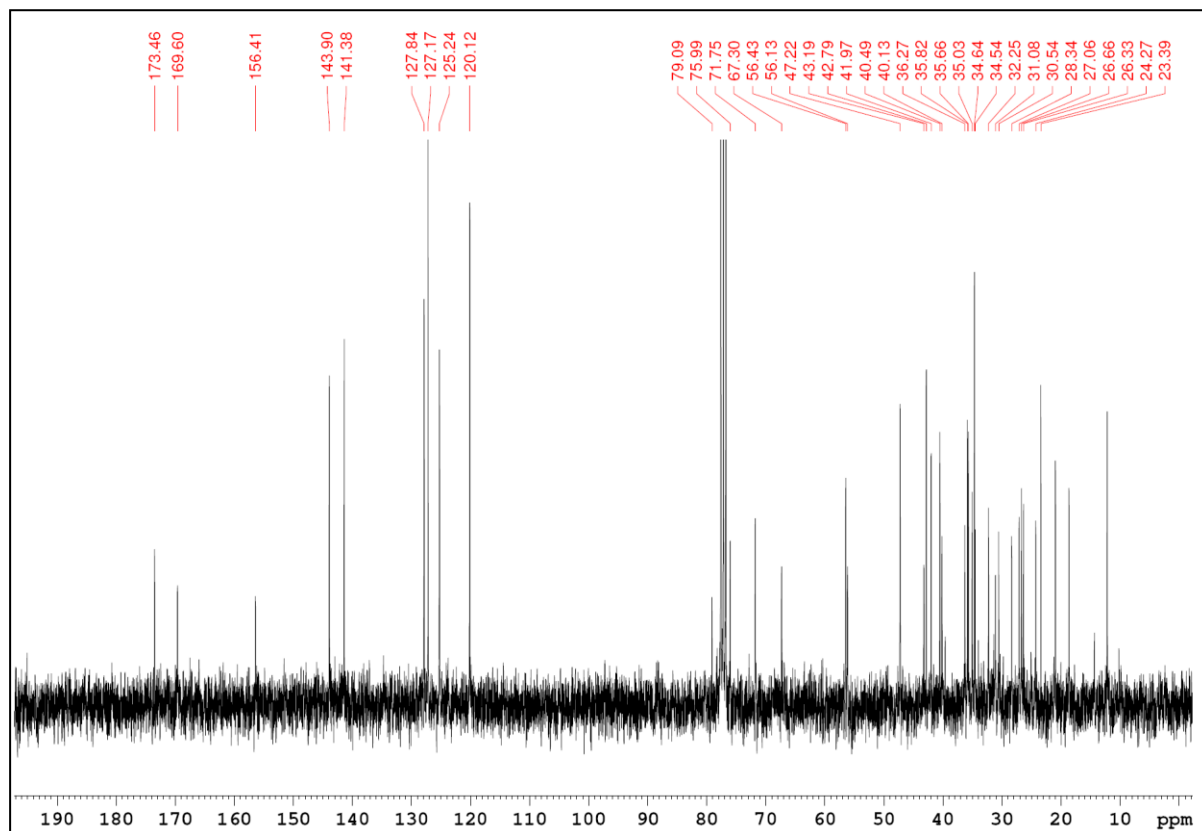
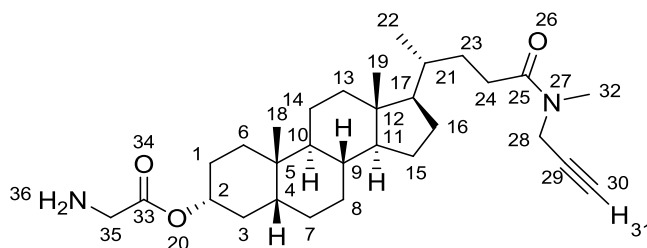


Abbildung 324: ¹³C-NMR (75.4 MHz, CDCl₃): N-Fmoc-glycin-lithocholsäure-N-methylpropargylamid 103.

5.3.1.13 Glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid **105**Ansatz:

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
103 (5.3.1.12)	706.95	1.0	0.14	0.1	
Piperidin	85.15	5 Vol%	6.83	0.58	0.5
CH ₂ Cl ₂					10.0

Durchführung:

0.1 g Fmoc-*N*-glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid **103** (0.14 mmol, 1 eq.) wurden in 10 mL Dichlormethan gelöst. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit 0.5 mL Piperidin (5 Vol.-%, 6.83 mmol) versetzt und 15 h bei RT gerührt. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels DC verfolgt. Das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt im Ölpumpenvakuum getrocknet. Nach säulenchromatographischer Reinigung (*n*-Hexan : Ethylacetat = 1:1) konnten 0.06 g (0.11 mmol) eines gelblichen Feststoffes erhalten.

Analytik:

Ausbeute: 82 %. **R_F:** 0.16 (*n*-Hexan : Ethylacetat = 1:1). **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ = 0.68 (s, 3H, H-19), 0.96 (s, 3H, H-18), 0.97 (d, ³*J*_{HH} = 7.02 Hz, 3H, H-22), 1.00-1.30 (m, 9H, H-6, H-7, H-8, H-11, H-13, H-14, H-15, H-16, H-17), 1.35-1.51 (m, 10H, H-1, H-3, H-4, H-8, H-9, H-10, H-14, H-15, H-23), 1.53-1.92 (m, 5H, H-3, H-6, H-7, H-16, H-21), 1.97-2.03 (m, 1H, H-13), 2.23 (t, ⁴*J*_{HH} = 2.49 Hz, 0.8H, H-31), 2.34-2.46 (m, 1H, H-24), 2.34 (t, ⁴*J*_{HH} = 2.49 Hz, 0.3H, H-31), 3.02 (s, 1H, H-32), 3.11 (s, 2H, H-32), 3.45 (m, 2H, H-36), 3.74 (m, 2H, H-35), 4.08 (s, 0.6H, H-28), 4.26 (s, 1.4H, H-28), 4.74-4.83 (m, 1H, H-2). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, CDCl₃): δ = 12.2 (C19), 18.7 (C22), 21.0 (C14), 23.4 (C18), 24.3 (C15), 26.4 (C8), 26.8 (C7), 27.1 (C16), 28.4 (C24), 30.5 (C1), 31.1 (C24), 31.4 (C23), 32.3 (C23), 33.5 (C32), 34.6 (C32), 34.7 (C5), 35.2 (C6), 35.7 (C21), 35.7 (C9), 35.9 (C28), 36.3 (C3), 39.6 (C28), 40.3 (C13), 40.5 (C10), 42.4 (C4), 42.9 (C12), 54.5 (C35), 56.3 (C17), 56.6 (C11), 71.7 (C30), 72.8 (C30), 75.1 (C2), 78.4 (C29), 79.2 (C29), 170.3 (C33), 173.4 (C25), 173.6 (C25). **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für C₃₀H₄₉N₂O₃: m/z 485.3738, gef.: m/z 485.3791; ber. für C₃₀H₄₈N₂O₃Na: m/z 507.3557, gef.: m/z 507.3609.

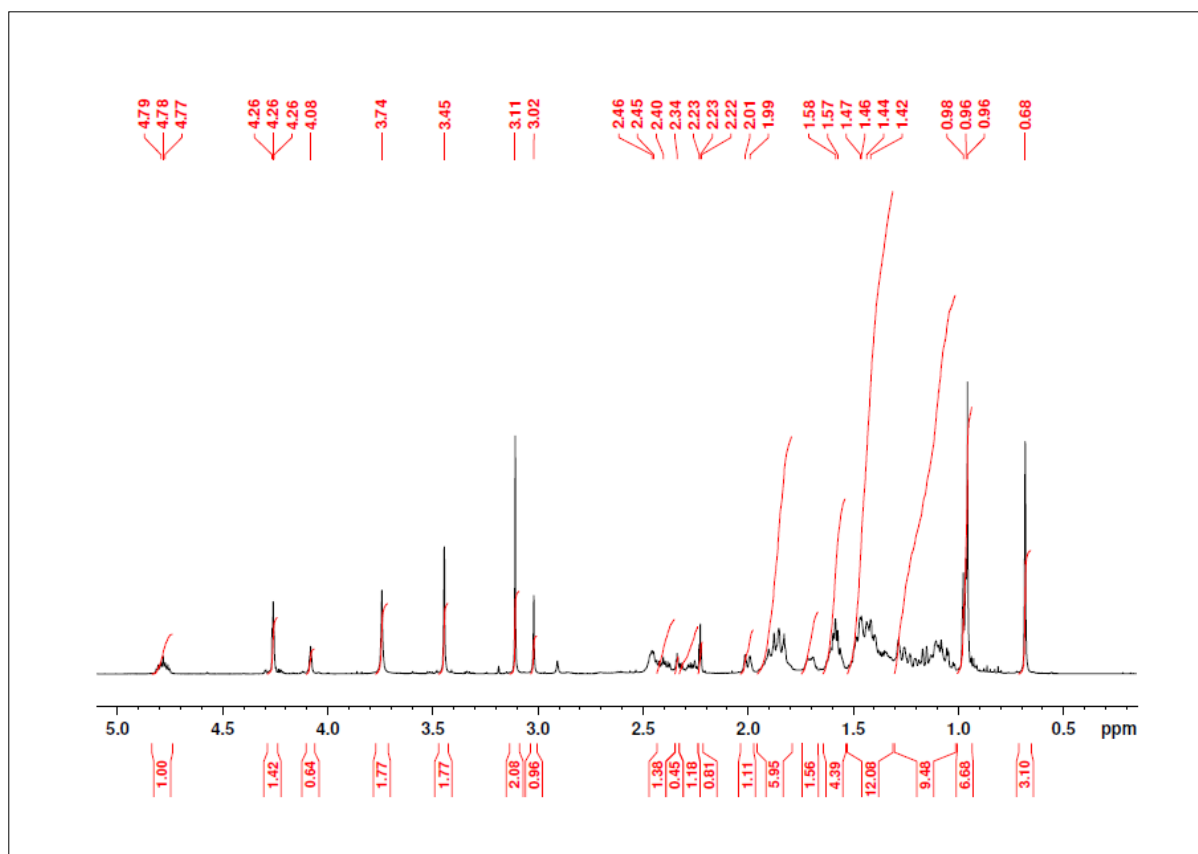


Abbildung 325: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): Glycin-lithocholsäure-N-methylpropargylamid 105.

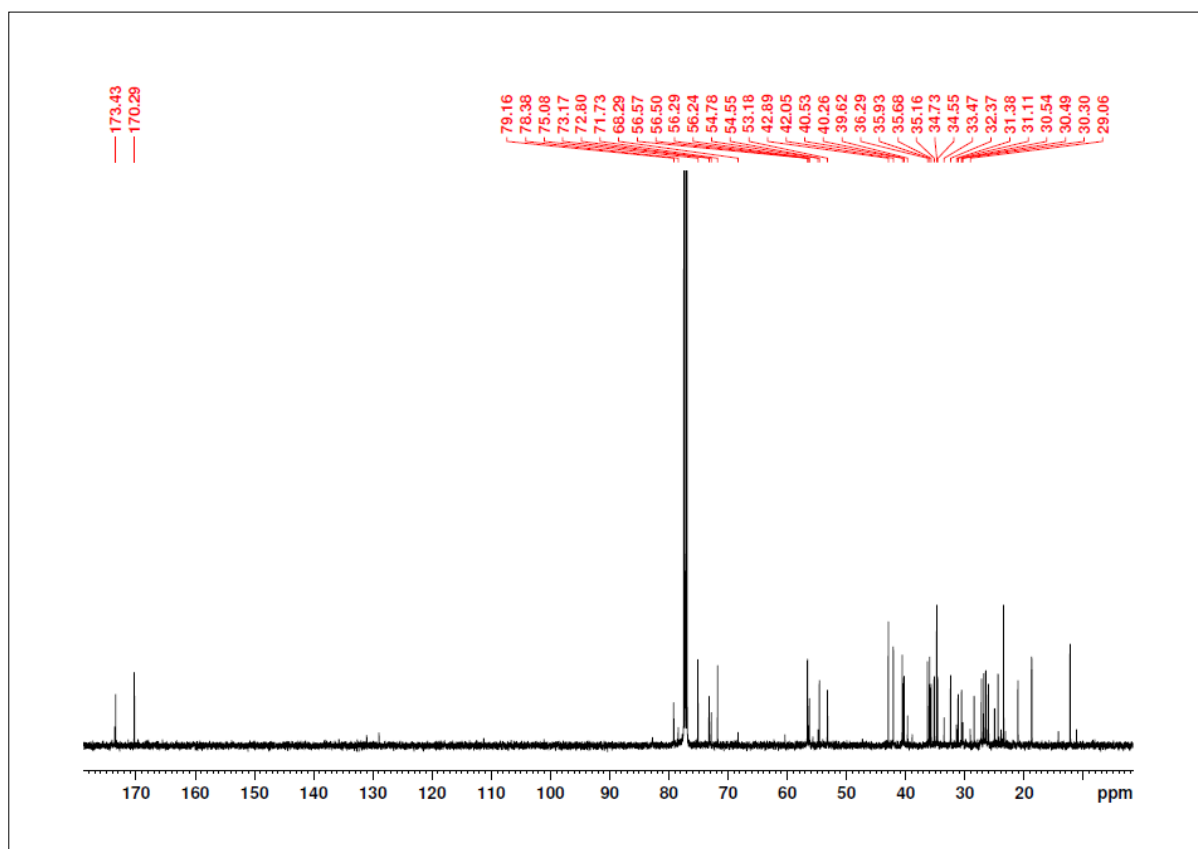
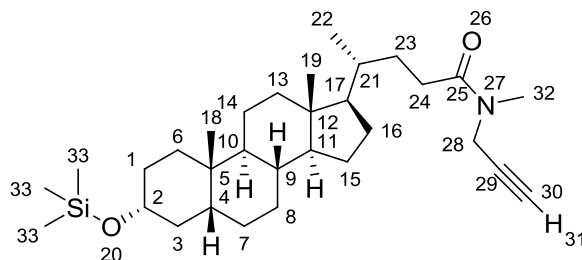


Abbildung 326: ¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃): Glycin-lithocholsäure-N-methylpropargylamid 105.

5.3.1.14 TMSO-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid 136Ansatz:

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
71 (5.3.1.1)	427.66		0.234	0.10	
Chlortrimethylsilan	108.64	3.0	0.702	0.077	0.09
DIEA	129.25	6.0	1.403	0.181	0.244
CH ₂ Cl ₂					15.0

Durchführung:

0.1 g Lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid (**71**) (0.234 mmol, 1 eq.) und 0.09 mL Chlortrimethylsilan (0.077 g, 0.702 mmol, 3 eq.) wurden in 15 mL Dichlormethan gelöst. Diese Lösung wurde anschließend mit 0.244 mL DIEA (1.403 mmol, 0.181 g, 6 eq.) versetzt und bei RT gerührt. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels DC verfolgt. Die Umsetzung war nach 6 h beendet. Das Reaktionsgemisch wurde mit 15 mL Dichlormethan verdünnt und die organische Phase mit 20 mL gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde abgetrennt und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der farblose Feststoff (0.2 g) im Ölpumpenvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wurde anschließend säulenchromatographisch gereinigt (*n*-Hexan : Ethylacetat = 2:1) und das Produkt im Ölpumpenvakuum getrocknet. Es konnten 0.111 g (0.222 mmol) eines farblosen, feinkristallinen Feststoffs isoliert werden.

Analytik:

Ausbeute: 95 %. **R_F:** 0.58 (*n*-Hexan : Ethylacetat = 2:1). **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ = 0.11 (s, 9H, H-33), 0.63 (s, 3H, H-19), 0.90 (s, 3H, H-18), 0.92 (d, $^3J_{HH}$ = 6.32 Hz, 3H, H-22), 0.99-1.00 (m, 1H, H-6), 1.01-1.23 (m, 8H, H-7, H-8, H-11, H-13, H-14, H-15, H-16, H-17), 1.25-1.46 (m, 8H, H-1, H-4, H-8, H-9, H-10, H-14, H-23), 1.47-1.51 (m, 1H, H-3), 1.52-1.54 (m, 1H, H-15), 1.55-1.59 (m, 1H, H-1), 1.71-1.89 (m, 5H, H-3, H-6, H-7, H-16, H-21), 1.93-1.97 (m, 1H, H-13), 2.19 (t, $^4J_{HH}$ = 2.23 Hz, 0.7H, H-31), 2.19-2.29 (m, 1H, H-24), 2.29 (t, $^4J_{HH}$ = 2.23 Hz, 0.3H, H-31), 2.33-2.42 (m, 1H, H-24), 2.98 (s, 1H, H-32), 3.07 (s, 2H, H-32), 3.35-3.62 (m, 1H, H-2), 4.05 (d, $^4J_{HH}$ = 2.23 Hz, 0.6H, H-28), 4.19 (d, $^4J_{HH}$ = 2.23 Hz, 1.3H, H-28). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, CDCl₃): δ = 0.4 (C33), 12.2 (C19), 18.6 (C22), 20.9 (C14), 23.5 (C18), 24.4 (C15), 26.5 (C8), 27.3 (C7), 28.4 (C16), 30.3 (C24), 30.5 (C1), 30.7 (C24), 31.0 (C24), 31.1 (C23), 31.4 (C23), 33.5 (C32), 34.4 (C32), 34.5 (C6), 35.6 (C21), 35.6 (C5), 35.9 (C9), 36.2 (C28), 36.5 (C3), 39.6 (C28), 40.2 (C13), 40.5 (C10), 42.2 (C4), 42.8 (C12), 56.1 (C17), 56.5 (C11), 71.7 (C30), 71.8 (C2), 71.8 (C30), 78.3 (C29), 79.0 (C29), 173.4 (C25), 173.6 (C25). **IR** (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3233 (w), 2926 (s), 2864 (m), 1631 (s), 1448 (m), 1399 (m), 1373 (m), 1248 (s), 1078 (s), 1016 (w), 951 (w), 884 (s), 835 (s), 747 (m), 681 (w). **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für C₃₁H₅₄NO₂Si: m/z 500.3918, gef.: m/z 500.4131; ber. für C₃₁H₅₃NO₂SiNa: m/z 522.3738, gef.: m/z 522.3793.

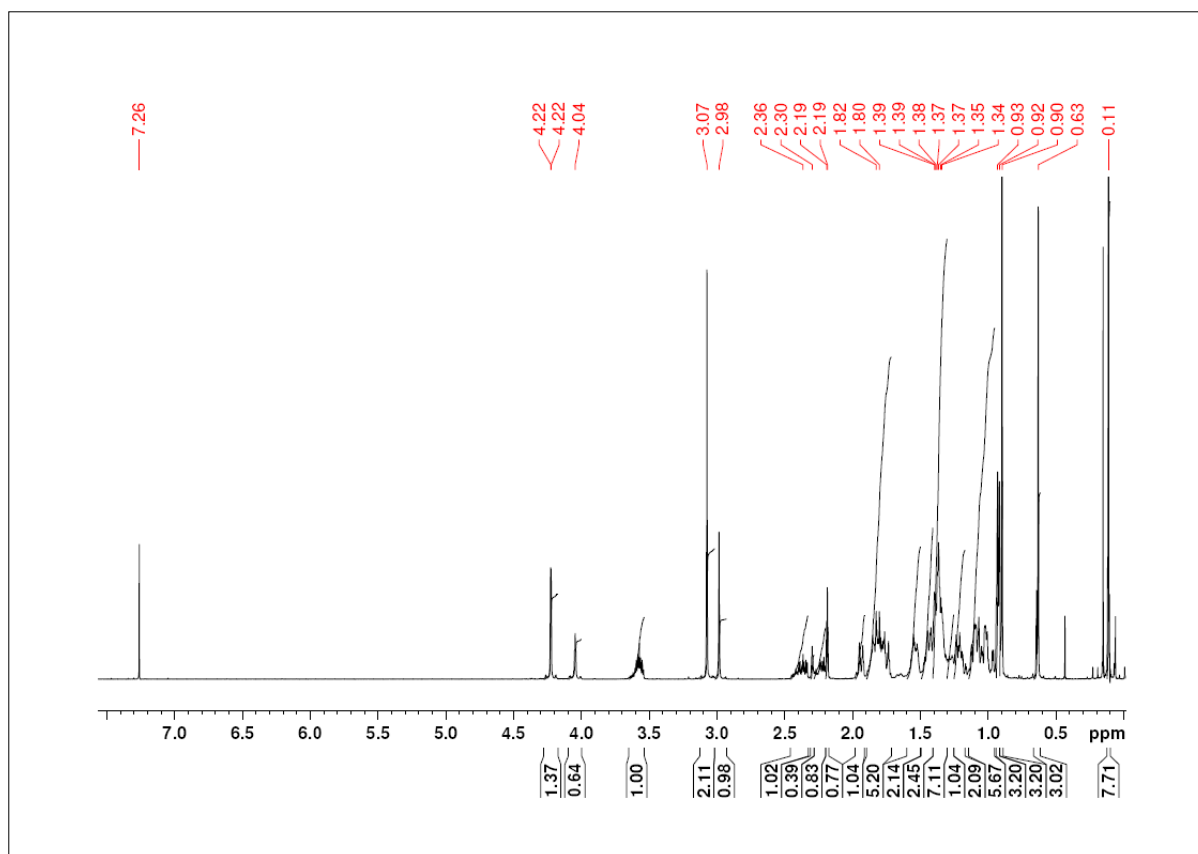


Abbildung 327: ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3): TMSO-lithocholsäure-N-methylpropargylamid 136.

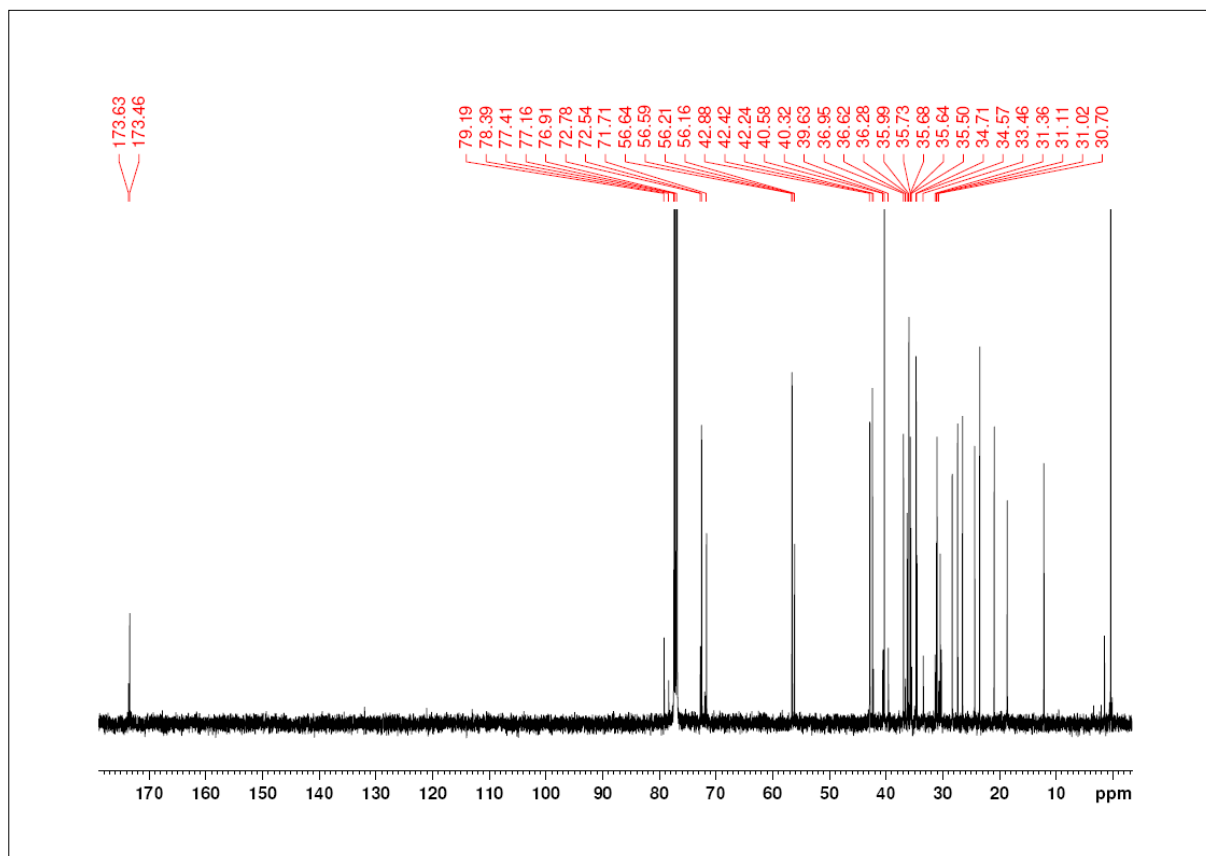
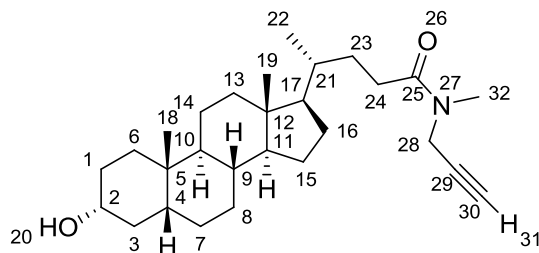


Abbildung 328: ^{13}C -NMR (125.7 MHz, CDCl_3): TMSO-lithocholsäure-N-methylpropargylamid 136.

5.3.1.15 HO-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid (71)Ansatz:

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
136 (5.3.1.14)	499.84	1.0	0.201	0.100	
1 N HCl					15.0
DCM					10.0

Durchführung:

0.1 g (0.201 mmol, 1 eq.) TMSO-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid **136** wurden in 10 mL Dichlormethan gelöst und dreimal mit je 5 mL 1 N Salzsäure unter starkem Rühren versetzt. Die organische Phase wurde abgetrennt und mit MgSO_4 getrocknet. Das Trocknungsmittel wurde abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde 48 h im Ölpumpenvakuum getrocknet. Es konnten 0.098 g (0.196 mmol) eines farblosen, feinkristallinen Feststoffs erhalten werden.

Analytik:

Ausbeute: 98 %. **R_F:** 0.17 (*n*-Hexan : Ethylacetat = 2:1). **Schmp.:** 98 °C. **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ = 0.61 (s, 3H, H-19), 0.88 (s, 3H, H-18), 0.89 (d, ³*J*_{HH} = 6.46 Hz, 3H, H-22), 0.92-0.99 (m, 1H, H-6), 1.01-1.23 (m, 8H, H-7, H-8, H-11, H-13, H-14, H-15, H-16, H-17), 1.25-1.43 (m, 8H, H-1, H-4, H-8, H-9, H-10, H-14, H-23), 1.45-1.49 (m, 1H, H-3), 1.51-1.55 (m, 1H, H-15), 1.60-1.63 (m, 1H, H-1), 1.69-1.87 (m, 5H, H-3, H-6, H-7, H-16, H-21), 1.90-1.93 (m, 1H, H-13), 2.03 (bs, 1H, H-20), 2.17 (t, ⁴*J*_{HH} = 2.49 Hz, 0.7H, H-31), 2.15-2.27 (m, 1H, H-24), 2.28 (t, ⁴*J*_{HH} = 2.49 Hz, 0.3H, H-31), 2.30-2.42 (m, 1H, H-24), 2.95 (s, 1H, H-32), 3.04 (s, 2H, H-32), 3.55-3.61 (m, 1H, H-2), 4.01 (s, 0.6H, H-28), 4.19 (s, 1.4H, H-28). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, CDCl₃): δ = 12.1 (C19), 18.6 (C22), 20.9 (C14), 23.4 (C18), 24.3 (C15), 26.5 (C8), 27.3 (C7), 28.3 (C16), 30.2 (C24), 30.4 (C1), 30.6 (C24), 31.0 (C23), 31.3 (C23), 33.4 (C32), 34.4 (C32), 34.5 (C6), 35.6 (C21), 35.6 (C5), 35.9 (C9), 36.2 (C28), 36.5 (C3), 39.6 (C28), 40.2 (C13), 40.5 (C10), 42.2 (C4), 42.8 (C12), 56.1 (C17), 56.5 (C11), 71.7 (C30), 71.8 (C2), 71.8 (C30), 78.3 (C29), 79.0 (C29), 173.4 (C25). **IR** (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3410 (w), 3269 (w), 2928 (s), 2858 (m), 2161 (w), 1980 (w), 1645 (s), 1467 (w), 1412 (w), 1296 (m), 1070 (m), 1041 (s). **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für C₂₈H₄₅NO₂Na: m/z 450.3343, gef.: m/z 450.3351.

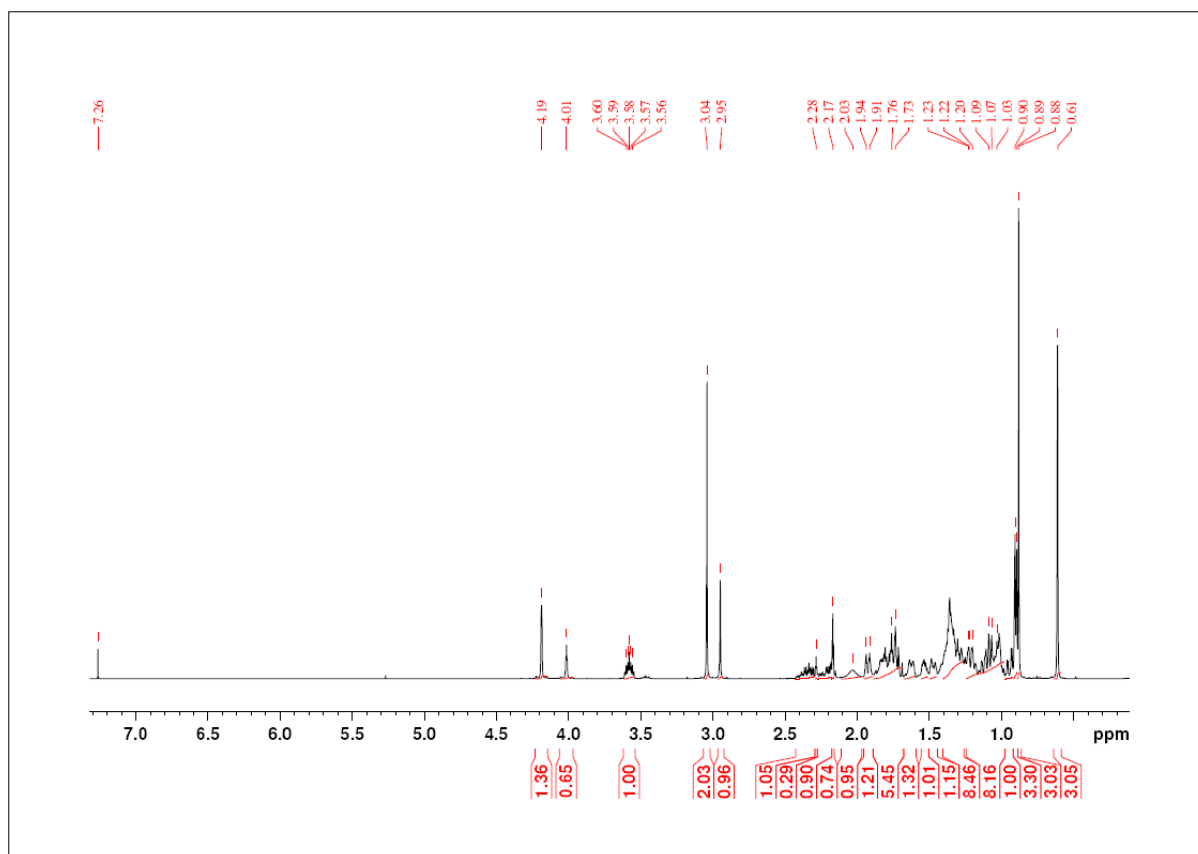


Abbildung 329: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): HO-lithocholsäure-N-methylpropargylamid (71).

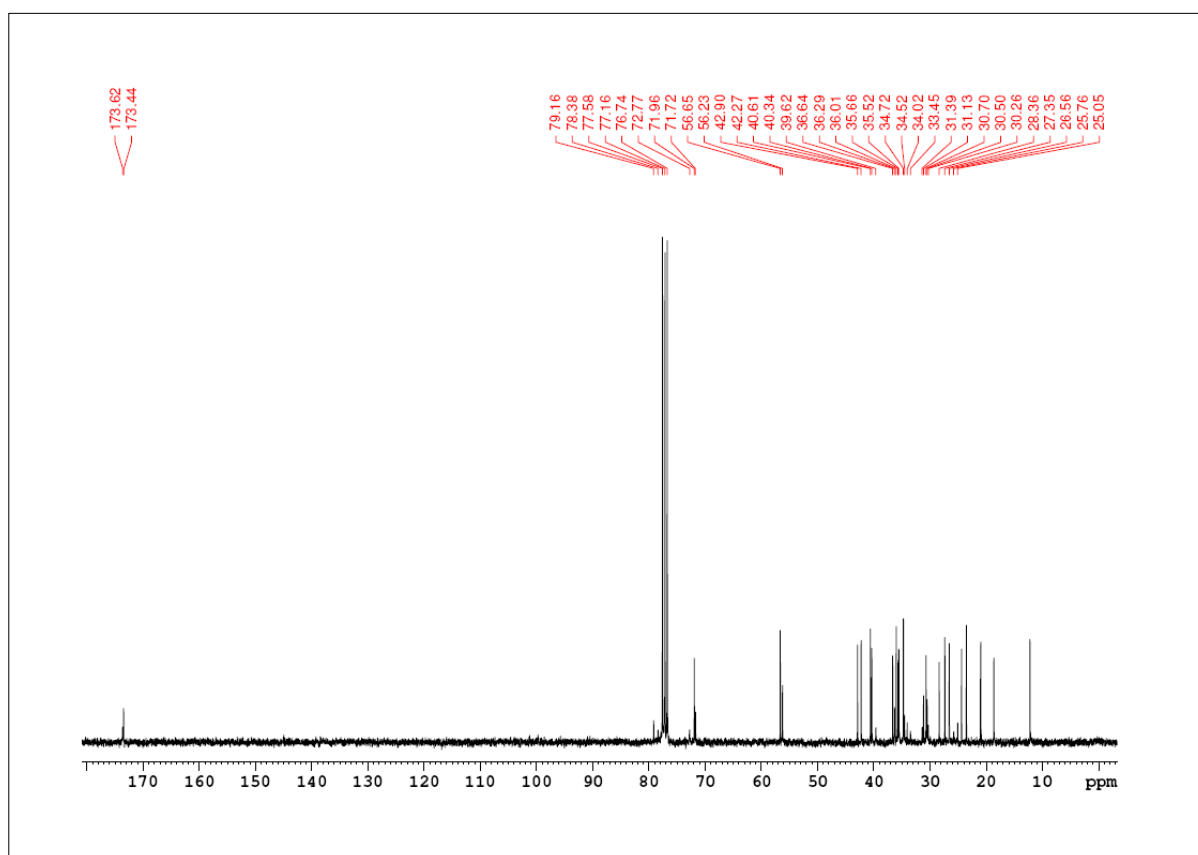
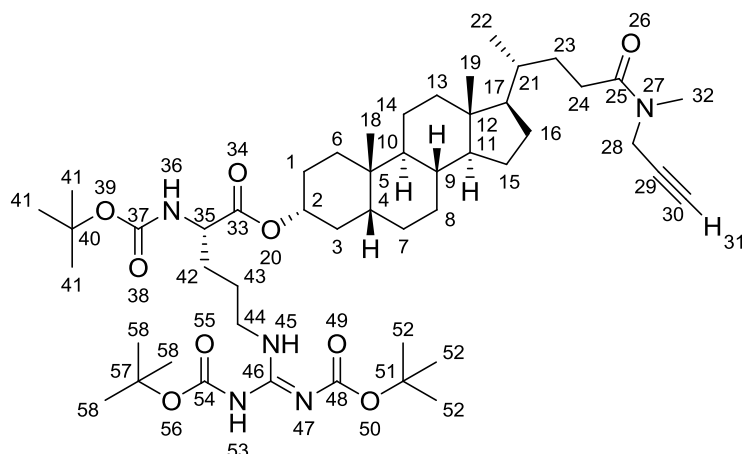


Abbildung 330: ¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃): HO-lithocholsäure-N-methylpropargylamid (71).

5.3.1.16 *N*-Boc-arginin(Boc)₂-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid **91**Ansatz:

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
<i>N</i> -Boc-arginin(Boc) ₂ -OH	474.55	1.2	0.561	0.266	
71 (5.3.1.1)	427.66	1.0	0.468	0.200	
HCTU	413.69	1.2	0.561	0.232	
Cl-HOBt	169.57	2.5	1.169	0.198	
DIEA	129.25	3.0	1.403	0.181	0.244
CH ₂ Cl ₂					10.0
DMF					5.0

Durchführung:

0.266 g *N*-Boc-arginin(Boc)₂-OH (0.561 mmol, 1.2 eq.) wurden in 15 mL eines 2 : 1-Gemisches aus Dichlormethan und *N,N'*-Dimethylformamid gelöst. Die Lösung wurde im Eisbad auf 0 °C gekühlt und mit 0.232 g HCTU (0.561 mmol, 1.2 eq.) und 0.198 g Cl-HOBt (1.169 mmol, 2.5 eq.) versetzt. Nachdem sich eine klare Lösung gebildet hatte, wurden 0.244 mL DIEA (0.181 g, 1.403 mmol, 3 eq.) zugegeben und das gelbe Gemisch für 10 min bei 0 °C gerührt. Nach Zugabe von 0.2 g Lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid (**71**) (0.468 mmol, 1.0 eq.) wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmt und für weitere 48 h gerührt. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels DC überprüft. Die Reaktionslösung wurde mit 30 mL Dichlormethan verdünnt. Die organische Phase wurde mit je 20 mL gesättigter NaHCO₃-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden mit Dichlormethan gegenextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das gelbliche Rohprodukt (0.3 g) wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet und anschließend säulenchromatogra-

phisch gereinigt (*n*-Hexan : Ethylacetat = 3:1). Es wurden 0.108 g (0.122 mmol) eines feinkristallinen, farblosen Feststoffs isoliert.

Analytik:

Ausbeute: 24 %. **R_F:** 0.18 (*n*-Hexan : Ethylacetat = 3:1). **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ = 0.62 (s, 3H, H-19), 0.89 (s, 3H, H-18), 0.91 (d, ³*J*_{HH} = 7.30 Hz, 3H, H-22), 0.92-0.99 (m, 1H, H-6), 1.03-1.23 (m, 8H, H-7, H-8, H-11, H-13, H-14, H-15, H-16, H-17), 1.25-1.43 (m, 8H, H-1, H-4, H-8, H-9, H-10, H-14, H-23), 1.47 (s, 9H, H-58), 1.47 (s, 9H, H-41), 1.45-1.49 (m, 1H, H-3), 1.49 (s, 9H, H-52), 1.51-1.55 (m, 1H, H-15), 1.59-1.63 (m, 2H, H-42), 1.60-1.63 (m, 1H, H-1), 1.69-1.87 (m, 5H, H-3, H-6, H-7, H-16, H-21), 1.80-1.95 (m, 2H, H-43), 1.90-1.93 (m, 1H, H-13), 2.18 (t, ⁴*J*_{HH} = 2.09 Hz, 0.7H, H-31), 2.16-2.27 (m, 1H, H-24), 2.28 (t, ⁴*J*_{HH} = 2.09 Hz, 0.3H, H-31), 2.31-2.43 (m, 1H, H-24), 2.96 (s, 1H, H-32), 3.05 (s, 2H, H-32), 3.80-3.92 (m, 2H, H-44), 4.02 (t, ⁴*J*_{HH} = 2.09 Hz, 0.7H, H-28), 4.20 (t, ⁴*J*_{HH} = 2.12 Hz, 1.3H, H-28), 4.20 (d, ³*J*_{HH} = 4.42 Hz, 1H, H-35), 4.70-4.77 (m, 1H, H-2), 5.29 (d, ³*J*_{HH} = 4.42 Hz, 1H, H-36), 9.16 (s, 1H, H-45), 9.33 (s, 1H, H-53). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, CDCl₃): δ = 12.1 (C19), 18.6 (C22), 20.9 (C14), 23.4 (C18), 24.3 (C15), 24.9 (C43), 36.4 (C42), 26.6 (C8), 27.0 (C7), 28.1 (C41), 28.3 (C16), 28.4 (C52), 28.5 (C58), 29.5 (C24), 30.2 (C1), 30.5 (C24), 31.1 (C23), 31.3 (C23), 32.2 (C32), 33.4 (C32), 34.5 (C6), 34.6 (C21), 35.0 (C5), 35.6 (C9), 35.9 (C28), 36.2 (C3), 39.6 (C28), 40.2 (C13), 40.5 (C10), 42.0 (C4), 42.8 (C12), 44.2 (C44), 53.6 (C17), 56.2 (C11), 56.5 (C35), 71.7 (C30), 72.8 (C30), 75.5 (C2), 78.3 (C29), 78.9 (C29), 79.1 (C40), 79.6 (C51), 83.9 (C57), 155.0 (C54), 155.5 (C37), 160.6 (C48), 163.8 (C46), 172.2 (C33), 173.4 (C25), 173.6 (C25). **IR** (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3372 (w), 2929 (w), 2868 (w), 2359 (w), 1713 (m), 1645 (m), 1609 (m), 1503 (w), 1455 (m), 1393 (m), 1367 (m), 1276 (s), 1242 (s), 1145 (s), 1095 (s), 1054 (m), 982 (m), 917 (m), 888 (w), 853 (w), 814 (w), 778 (w), 729 (w). **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für C₄₉H₈₂N₅O₉: m/z 884.6107, gef.: m/z 884.6194; ber. für C₄₉H₈₁N₅O₉Na: m/z 906.5927, gef.: m/z 906.6011.

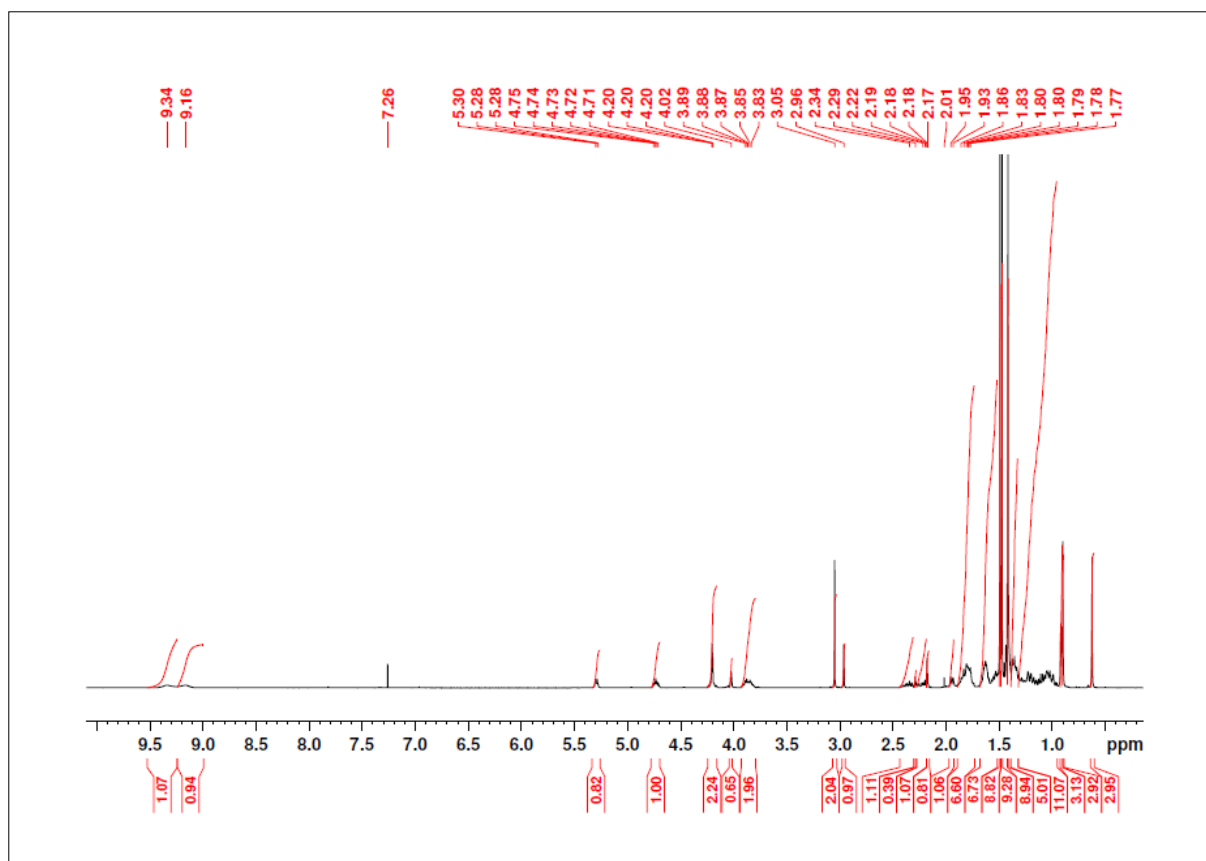


Abbildung 331: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): *N*-Boc-arginin(Boc)₂-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid 91.

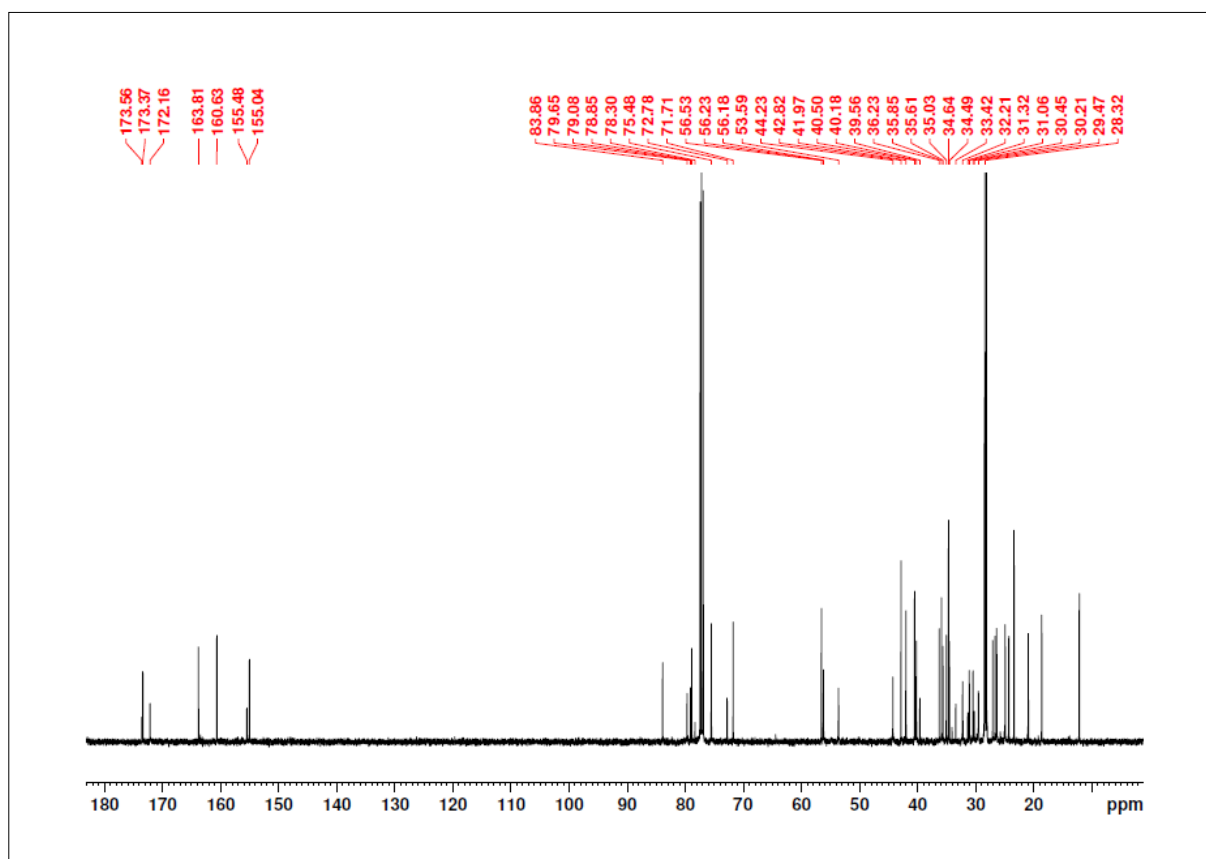
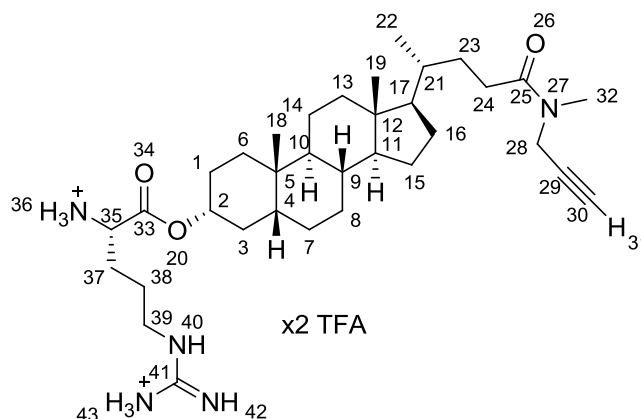


Abbildung 332: ¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃): *N*-Boc-arginin(Boc)₂-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid 91.

5.3.1.17 Trifluoracetat-arginin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid **93**Ansatz:

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
91 (5.3.1.16)	884.60	1.0	0.122	0.108	
TFA					2.0
CH ₂ Cl ₂					10.0
Benzol					30.0

Durchführung:

0.108 g (0.122 mmol) *N*-Boc-arginin(Boc₂)-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid **91** wurden in 10 mL Dichlormethan gelöst und mit 2 mL Trifluoressigsäure versetzt. Die Reaktionslösung wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt und der Reaktionsfortschritt mittels DC überprüft. Die Lösung wurde mit 10 mL Benzol verdünnt und anschließend am Rotationsverdampfer auf 2 mL eingengt. Das so erhaltene Konzentrat wurde dreimal mit je 10 mL Benzol aufgenommen und wiederum eingengt, um die überschüssige Trifluoressigsäure im azeotropen Gemisch vollständig zu entfernen. Das Produkt wurde 48 h im Ölpumpenvakuum getrocknet. Es konnten 0.094 g (0.121 mmol) eines farblosen Feststoffs erhalten werden.

Analytik:

Ausbeute: 99 %. **R_F:** 0.05 (*n*-Hexan : Ethylacetat = 1:1). **¹H-NMR** (500 MHz, MeOD-*d*₄ = 5:1): δ = 0.64 (s, 3H, H-19), 0.93 (s, 3H, H-18), 0.94 (d, ³*J*_{HH} = 6.90 Hz, 3H, H-22), 0.98-1.03 (m, 1H, H-6), 1.03-1.23 (m, 8H, H-7, H-8, H-11, H-13, H-14, H-15, H-16, H-17), 1.25-1.43 (m, 8H, H-1, H-4, H-8, H-9, H-10, H-14, H-23), 1.45-1.50 (m, 1H, H-3), 1.51-1.55 (m, 1H, H-15), 1.60-1.63 (m, 1H, H-1), 1.63-1.79 (m, 5H, H-3, H-6, H-7, H-16, H-21), 1.80-1.95 (m, 2H, H-38), 1.90-1.93 (m, 1H, H-13), 1.94-2.03 (m, 2H, H-37), 2.18-2.30 (m, 1H, H-24), 2.31 (t, ⁴*J*_{HH} = 2.51 Hz, 0.7H, H-31), 2.34-2.45 (m, 1H, H-24), 2.46 (t, ⁴*J*_{HH} = 2.51 Hz, 0.3H, H-31), 2.96 (s, 1H, H-32), 3.09 (s, 2H, H-32), 3.19 (t, ³*J*_{HH} = 6.87 Hz, 2H, H-39), 3.90 (t, ³*J*_{HH} = 6.89 Hz, 1H, H-35), 4.07 (t, ⁴*J*_{HH} = 2.51 Hz, 0.7H, H-28), 4.16 (t, ⁴*J*_{HH} = 2.51 Hz, 1.3H, H-28), 4.78-4.84 (m, 1H, H-2). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄ = 1:1): δ = 11.7 (C19), 18.1 (C22), 20.6 (C14), 22.9 (C18), 23.7 (C15), 23.9 (C38), 26.1 (C37), 26.7 (C8), 27.2 (C7), 28.0 (C16), 29.9 (C24), 30.2 (C1), 30.8 (C24), 31.1 (C23), 31.7 (C23), 33.1 (C32), 33.3 (C32), 34.4 (C6), 34.6 (C21), 35.4 (C5), 35.6 (C9), 35.6 (C28), 36.1 (C3), 39.4 (C28), 39.8 (C13), 40.2 (C10), 40.3 (C4), 41.7 (C12), 42.5 (C39), 52.1 (C17), 55.8 (C11), 56.2 (C35), 71.8 (C30), 72.9 (C30), 77.3 (C2), 77.5 (C29), 78.1 (C29), 163.8 (C41), 168.3 (C33), 174.1 (C25), 174.4 (C25). **IR** (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3347 (w), 3176 (w), 2931 (m), 2866 (w), 2359 (w), 1740 (m), 1668 (s), 1621 (s), 1451 (m), 1428 (m), 1199 (s), 1177 (s), 1131 (s), 974 (m), 912 (w), 836 (m), 799 (m), 721 (m). **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für C₃₄H₅₈N₅O₃: *m/z* 584.4535, gef.: *m/z* 584.4600; ber. für C₃₄H₅₉N₅O₃: *m/z* 292.7303, gef.: *m/z* 292.7337.

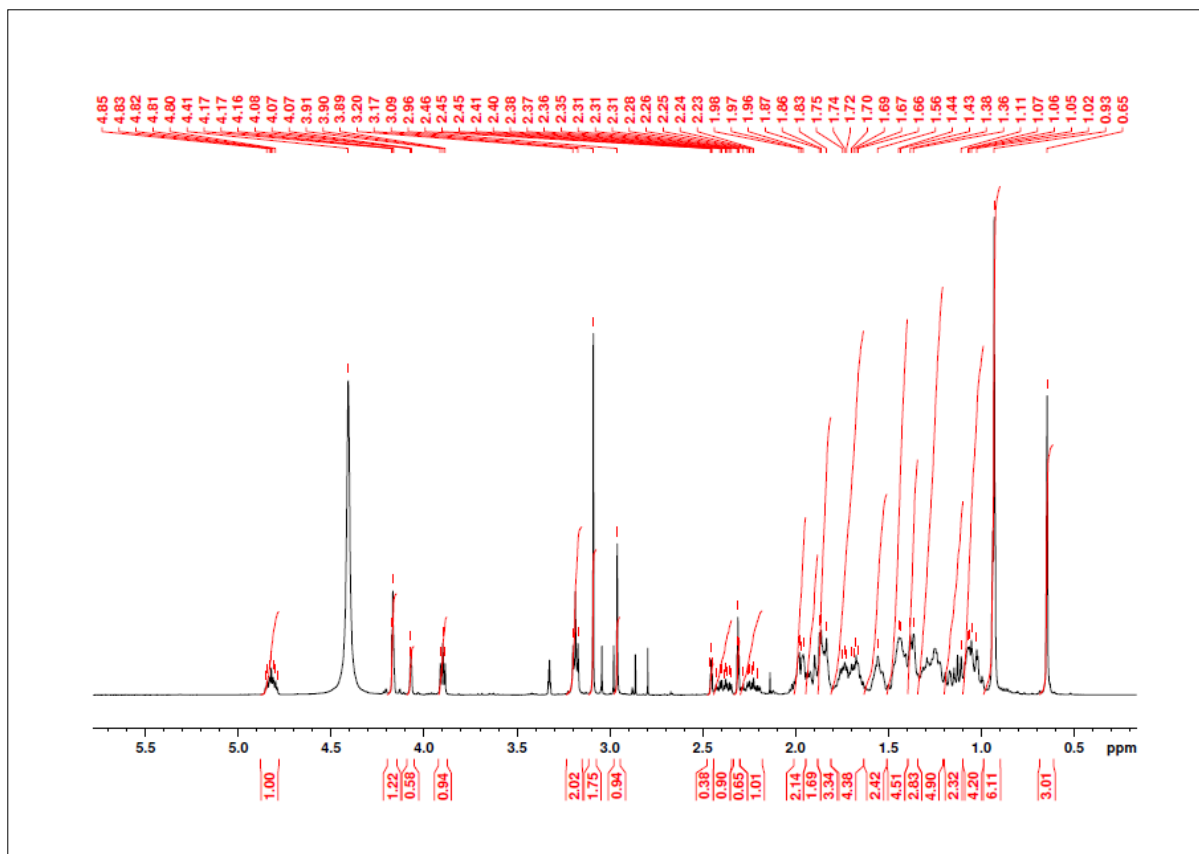


Abbildung 333: ^1H -NMR (500 MHz, $\text{MeOD-}d_4$): Trifluoracetat-arginin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid 93.

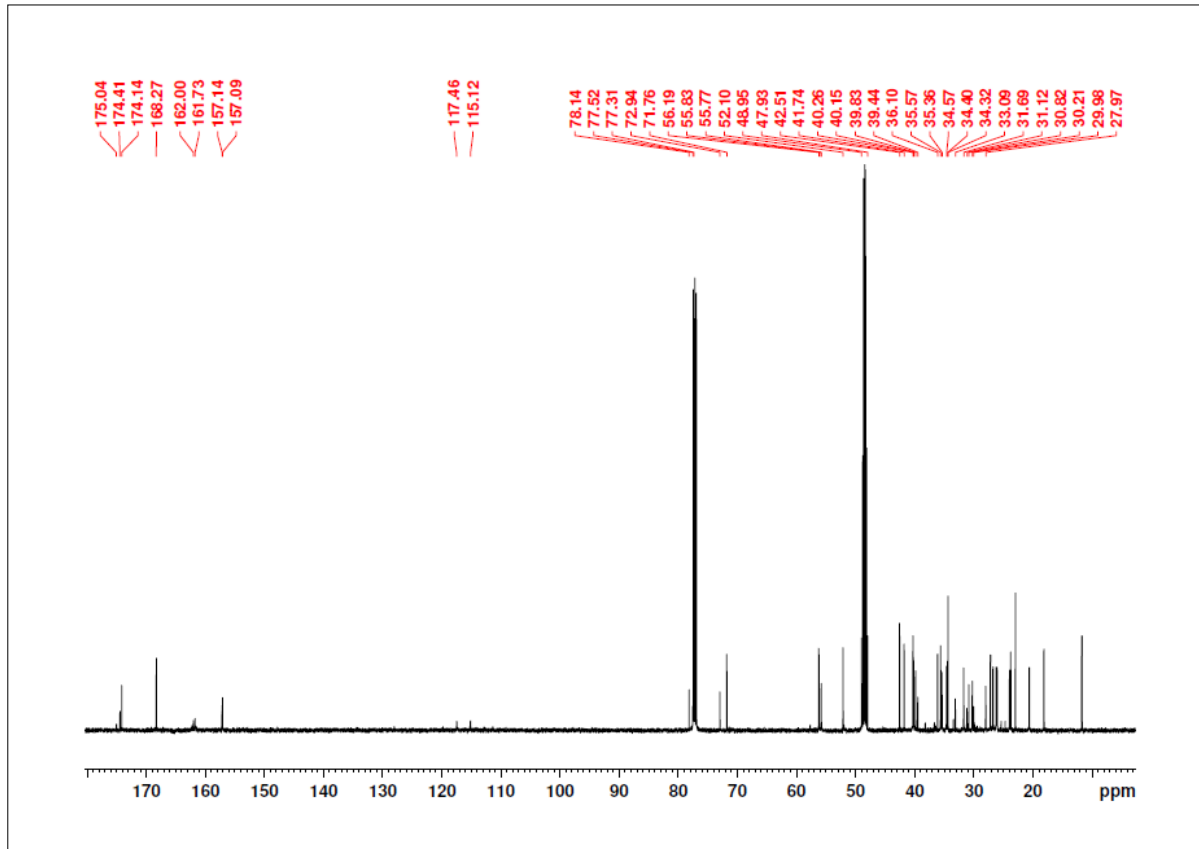
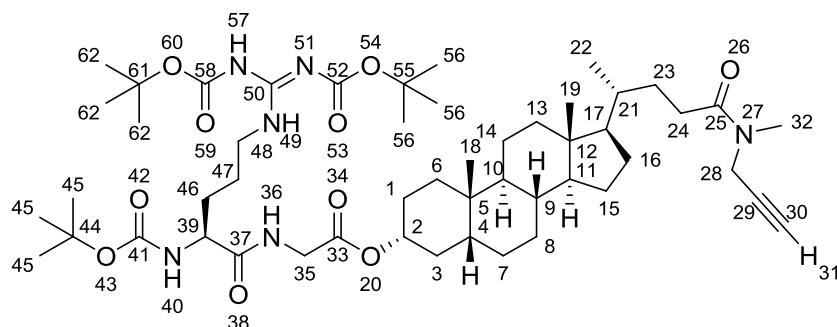


Abbildung 334: ^{13}C -NMR (125.7 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOD-}d_4 = 1:1$): Trifluoracetat-arginin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid 93.

5.3.1.18 *N*-Boc-arginin(Boc)₂-*N*-glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid **92****Ansatz:**

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
<i>N</i> -Boc-arginin(Boc) ₂ -OH	474.55	1.2	0.209	0.099	
73 (5.3.1.3)	598.74	1.0	0.174	0.104	
HCTU	413.69	1.2	0.209	0.086	
Cl-HOBt	169.57	2.5	0.434	0.074	
DIEA	129.25	6.0	1.042	0.134	0.182
CH ₂ Cl ₂					10.0
DMF					10.0

Durchführung:

0.099 g *N*-Boc-arginin(Boc)₂-OH (0.209 mmol, 1.2 eq.) wurden in 15 mL eines 2 : 1-Gemisches aus Dichlormethan und *N,N'*-Dimethylformamid gelöst. Die Lösung wurde im Eisbad auf 0 °C gekühlt und mit 0.086 g HCTU (0.209 mmol, 1.2 eq.) und 0.074 g Cl-HOBt (0.434 mmol, 2.5 eq.) versetzt. Nachdem sich eine klare Lösung gebildet hatte, wurden 0.091 mL DIEA (0.067 g, 0.521 mmol, 3 eq.) zugegeben und das gelbe Gemisch für 10 min bei 0 °C gerührt. 0.104 g Trifluoracetat-glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid **73** (0.174 mmol, 1.0 eq.) wurden in 5 mL *N,N'*-Dimethylformamid gelöst und mit 0.091 mL DIEA (0.067 g, 0.521 mmol, 3 eq.) versetzt. Diese Lösung wurde zum Reaktionsgemisch gegeben, die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmt und für weitere 24 h gerührt. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels DC überprüft. Die Reaktionslösung wurde mit 30 mL Dichlormethan verdünnt. Die organische Phase wurde mit je 20 mL gesättigter NaHCO₃-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden mit Dichlormethan gegenextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das gelbliche Rohprodukt (0.4 g) wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet und anschließend säulenchromatographisch gereinigt.

(*n*-Hexan : Ethylacetat = 1:1). Es wurden 0.122 g (0.130 mmol) eines feinkristallinen, farblosen Feststoffs isoliert.

Analytik:

Ausbeute: 76 %. **R_F:** 0.51 (*n*-Hexan : Ethylacetat = 1:1). **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ = 0.61 (s, 3H, H-19), 0.88 (s, 3H, H-18), 0.90 (d, ³*J*_{HH} = 7.42 Hz, 3H, H-22), 0.92-0.99 (m, 1H, H-6), 1.03-1.23 (m, 8H, H-7, H-8, H-11, H-13, H-14, H-15, H-16, H-17), 1.25-1.39 (m, 8H, H-1, H-4, H-8, H-9, H-10, H-14, H-23), 1.41 (s, 9H, H-62), 1.45 (s, 9H, H-45), 1.45-1.49 (m, 1H, H-3), 1.48 (s, 9H, H-56), 1.51-1.55 (m, 1H, H-15), 1.59-1.63 (m, 2H, H-46), 1.60-1.63 (m, 1H, H-1), 1.66-1.75 (m, 5H, H-3, H-6, H-7, H-16, H-21), 1.76-1.88 (m, 2H, H-47), 1.90-1.96 (m, 1H, H-13), 2.17 (t, ⁴*J*_{HH} = 2.57 Hz, 0.7H, H-31), 2.15-2.27 (m, 1H, H-24), 2.28 (t, ⁴*J*_{HH} = 2.57 Hz, 0.3H, H-31), 2.29-2.43 (m, 1H, H-24), 2.96 (s, 1H, H-32), 3.05 (s, 2H, H-32), 3.77-4.02 (m, 2H, H-48), 4.02 (t, ⁴*J*_{HH} = 2.09 Hz, 0.7H, H-28), 4.20 (t, ⁴*J*_{HH} = 2.12 Hz, 1.3H, H-28), 4.20 (m, 1H, H-39), 4.30 (s, 2H, H-35), 4.69-4.73 (m, 1H, H-2), 5.81 (d, ³*J*_{HH} = 5.39 Hz, 1H, H-40), 7.41 (s, 1H, H-36), 9.26 (s, 1H, H-49), 9.41 (s, 1H, H-57). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, CDCl₃): δ = 12.1 (C19), 18.6 (C22), 20.9 (C14), 23.4 (C18), 24.3 (C15), 24.4 (C47), 26.6 (C46), 26.9 (C8), 27.0 (C7), 28.1 (C45), 28.3 (C16), 28.4 (C56), 28.5 (C61), 29.4 (C24), 30.2 (C1), 30.4 (C24), 30.7 (C24), 31.0 (C23), 31.3 (C23), 32.2 (C32), 33.4 (C32), 34.5 (C6), 34.6 (C21), 35.0 (C5), 35.6 (C9), 35.9 (C28), 36.2 (C3), 39.6 (C28), 40.2 (C4), 40.5 (C13), 41.7 (C28), 42.0 (C35), 42.8 (C48), 43.9 (C12), 53.3 (C17), 56.2 (C11), 56.6 (C39), 71.7 (C30), 72.8 (C30), 75.7 (C2), 78.3 (C29), 79.1 (C29), 79.5 (C44), 79.7 (C55), 84.1 (C61), 154.5 (C58), 155.5 (C41), 161.1 (C52), 163.3 (C50), 169.0 (C33), 172.3 (C37), 173.4 (C25), 173.5 (C25). **IR** (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3375 (w), 2931 (w), 2867 (w), 2361 (w), 1711 (m), 1645 (m), 1607 (m), 1506 (m), 1454 (m), 1390 (m), 1365 (m), 1271 (s), 1248 (s), 1145 (s), 1096 (s), 1051 (m), 981 (m), 914 (w), 887 (w), 852 (w), 811 (w), 779 (w), 729 (w). **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für C₅₁H₈₅N₆O₁₀: m/z 941.6322, gef.: m/z 941.6401; ber. für C₅₁H₈₄N₆O₁₀Na: m/z 963.6141, gef.: m/z 963.6216; ber. für C₄₆H₇₆N₆O₈: m/z 841.5832, gef.: m/z 841.5863; ber. für C₄₁H₆₇N₆O₆: m/z 741.5413, gef.: m/z 741.5498.

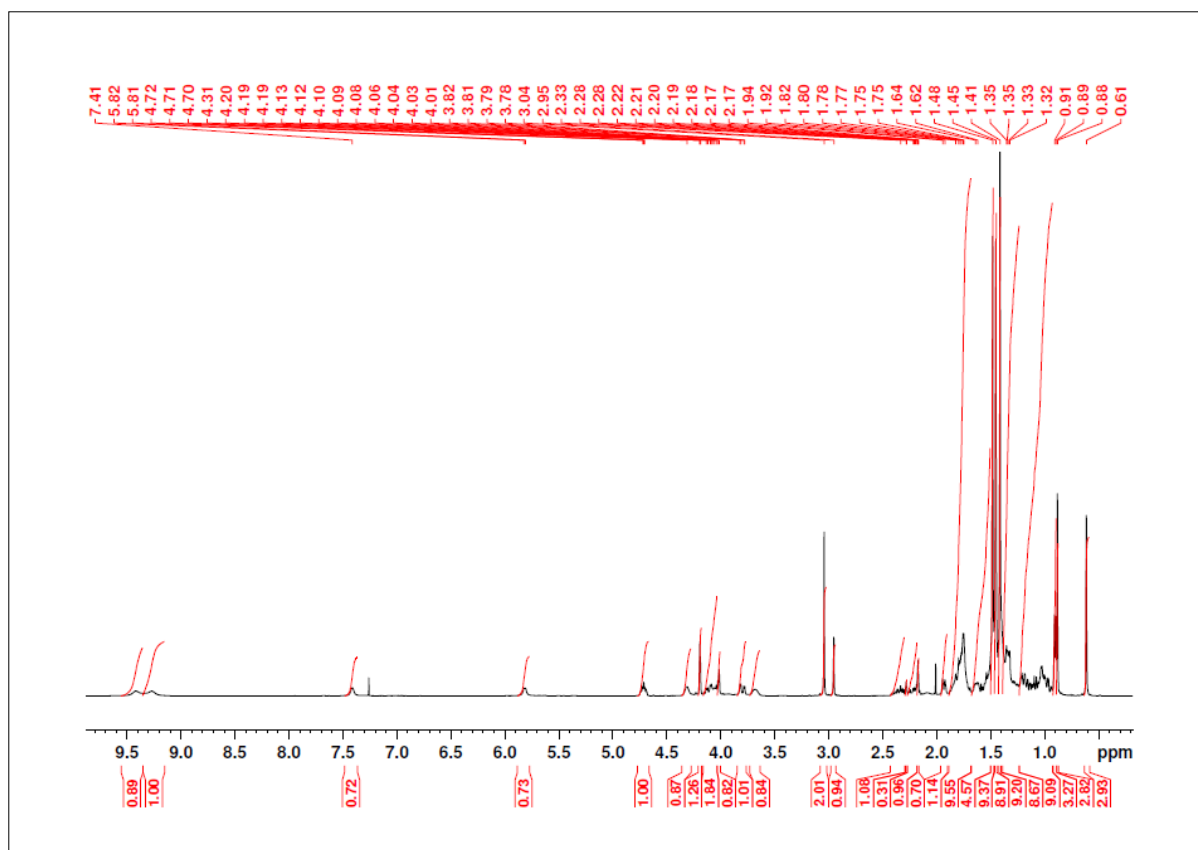


Abbildung 335: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): *N*-Boc-arginin(Boc)₂-*N*-glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid 92.

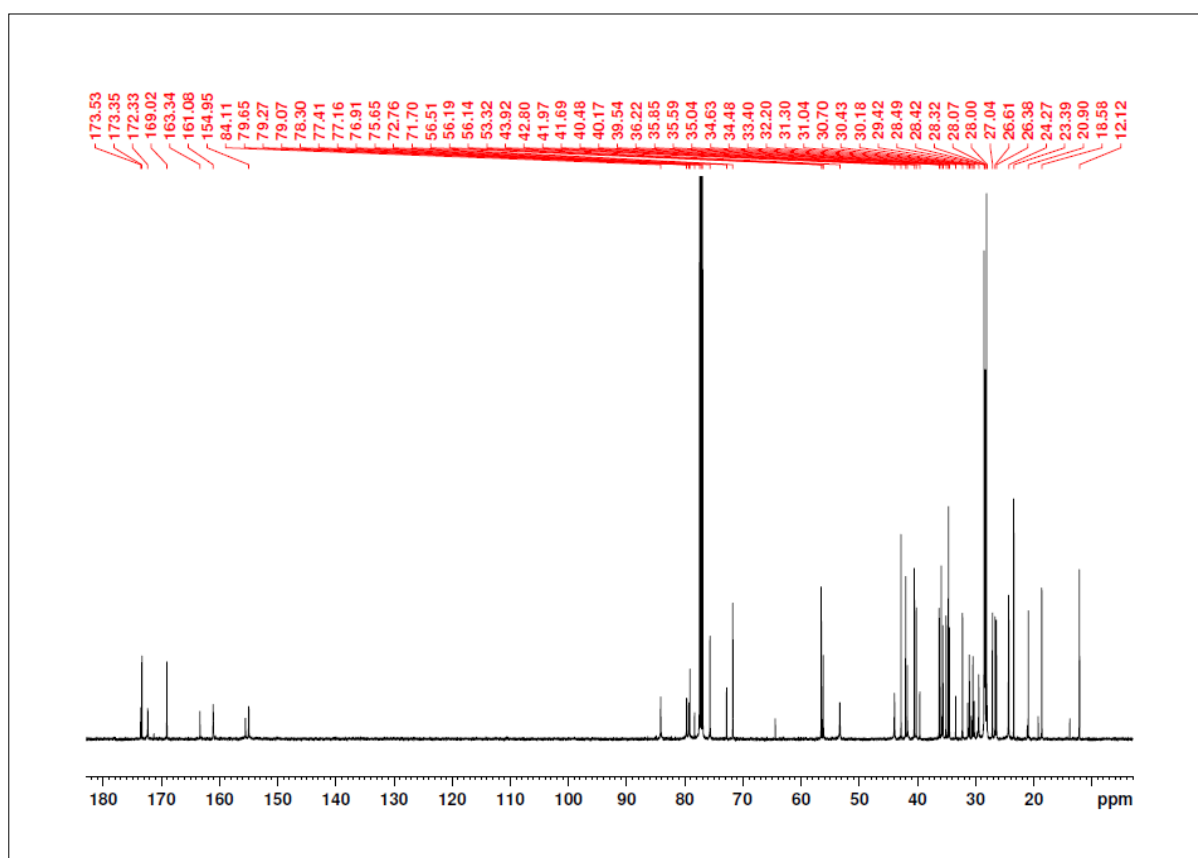
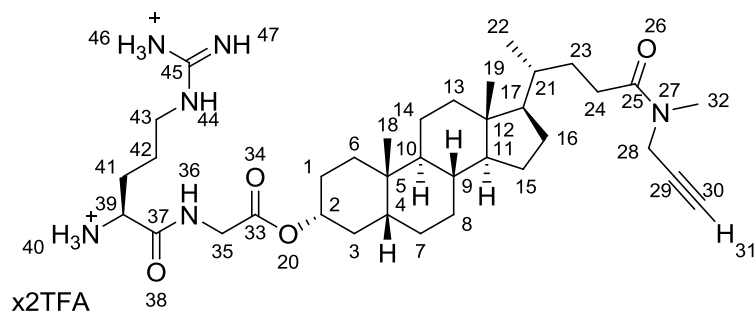


Abbildung 336: ¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃): *N*-Boc-arginin(Boc)₂-*N*-glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid 92.

5.3.1.19 Trifluoracetat-arginin-*N*-glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid **94****Ansatz:**

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
92 (5.3.1.18)	941.25	1.0	0.130	0.122	
TFA					2.0
CH ₂ Cl ₂					10.0
Benzol					30.0

Durchführung:

0.122 g *N*-Boc-arginin(Boc)-*N*-glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid **92** (0.130 mmol 1 eq.) wurden in 10 mL Dichlormethan gelöst und mit 2 mL Trifluoressigsäure versetzt. Die Reaktionslösung wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt und der Reaktionsfortschritt mittels DC überprüft. Die Lösung wurde mit 10 mL Benzol verdünnt und anschließend am Rotationsverdampfer auf 2 mL eingengt. Das so erhaltene Konzentrat wurde dreimal mit je 10 mL Benzol aufgenommen und wiederum eingengt, um die überschüssige Trifluoressigsäure im azeotropen Gemisch vollständig zu entfernen. Das Produkt wurde 48 h im Ölpumpenvakuum getrocknet. Es konnten 0.107 g (0.128 mmol) eines farblosen Feststoffs erhalten werden.

Analytik:

Ausbeute: 99 %. **¹H-NMR** (500 MHz, MeOD-*d*₄): δ = 0.61 (s, 3H, H-19), 0.89 (s, 3H, H-18), 0.90 (d, $^3J_{HH}$ = 7.56 Hz, 3H, H-22), 0.93-1.00 (m, 1H, H-6), 1.04-1.24 (m, 8H, H-7, H-8, H-11, H-13, H-14, H-15, H-16, H-17), 1.26-1.40 (m, 8H, H-1, H-4, H-8, H-9, H-10, H-14, H-23), 1.46-1.50 (m, 1H, H-3), 1.52-1.56 (m, 1H, H-15), 1.60-1.64 (m, 2H, H-41), 1.64-1.66 (m, 1H, H-1), 1.67-1.76 (m, 5H, H-3, H-6, H-7, H-16, H-21), 1.77-1.89 (m, 2H, H-42), 1.90-1.97 (m, 1H, H-13), 2.10-2.23 (m, 1H, H-24), 2.25 (t, $^4J_{HH}$ = 2.56 Hz, 0.7H, H-31), 2.31-2.44 (m, 1H, H-24), 2.37 (t, $^4J_{HH}$ = 2.56 Hz, 0.3H, H-31), 2.93 (s, 1H, H-32), 3.06 (s, 2H, H-32), 3.15-3.24 (m, 2H, H-43), 3.92 (s, 2H, H-35), 4.03 (t, $^4J_{HH}$ = 2.09 Hz, 0.7H, H-28), 4.15 (t, $^4J_{HH}$ = 2.12 Hz, 1.3H, H-28), 4.17 (m, 1H, H-39), 4.66-4.75 (m, 1H, H-2). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄ = 1:1): δ = 12.2 (C19), 18.6 (C22), 21.0 (C14), 23.4 (C18), 23.9 (C15), 24.4 (C42), 26.5 (C41), 26.7 (C8), 27.2 (C7), 28.4 (C16), 29.5 (C24), 30.4 (C1), 30.7 (C24), 31.3 (C23), 31.6 (C23), 32.3 (C32), 33.6 (C32), 34.7 (C6), 34.8 (C21), 35.1 (C5), 35.8 (C9), 36.0 (C28), 36.5 (C3), 40.3 (C28), 40.2 (C13), 40.5 (C10), 40.7 (C4), 41.5 (C12), 42.2 (C43), 52.7 (C17), 56.2 (C11), 56.5 (C35), 56.7 (C39), 72.2 (C30), 72.8 (C30), 76.4 (C2), 78.0 (C29), 78.6 (C29), 169.4 (C33), 169.6 (C37), 174.5 (C25), 174.8 (C25). **IR** (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3346 (w), 3173 (w), 2935 (m), 2867 (w), 2361 (w), 1740 (m), 1669 (s), 1622 (s), 1454 (m), 1429 (m), 1197 (s), 1175 (s), 1132 (s), 971 (m), 913 (w), 836 (m), 777 (m), 722 (m). **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für C₃₆H₆₁N₆O₄: m/z 641.4749, gef.: m/z 641.4819.

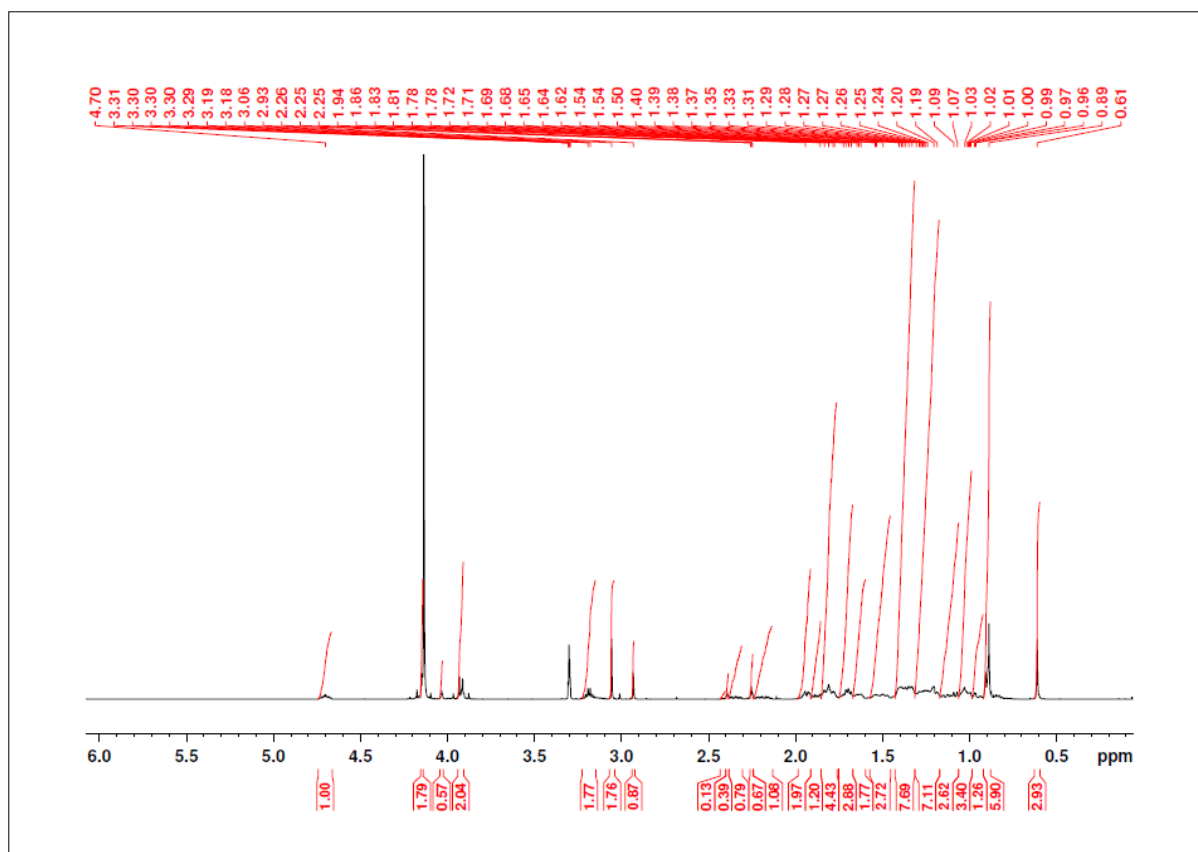


Abbildung 337: ¹H-NMR (500 MHz, MeOD-*d*₄): Trifluoracetat-arginin-N-glycin-lithocholsäure-N-methylpropargylamid 94.

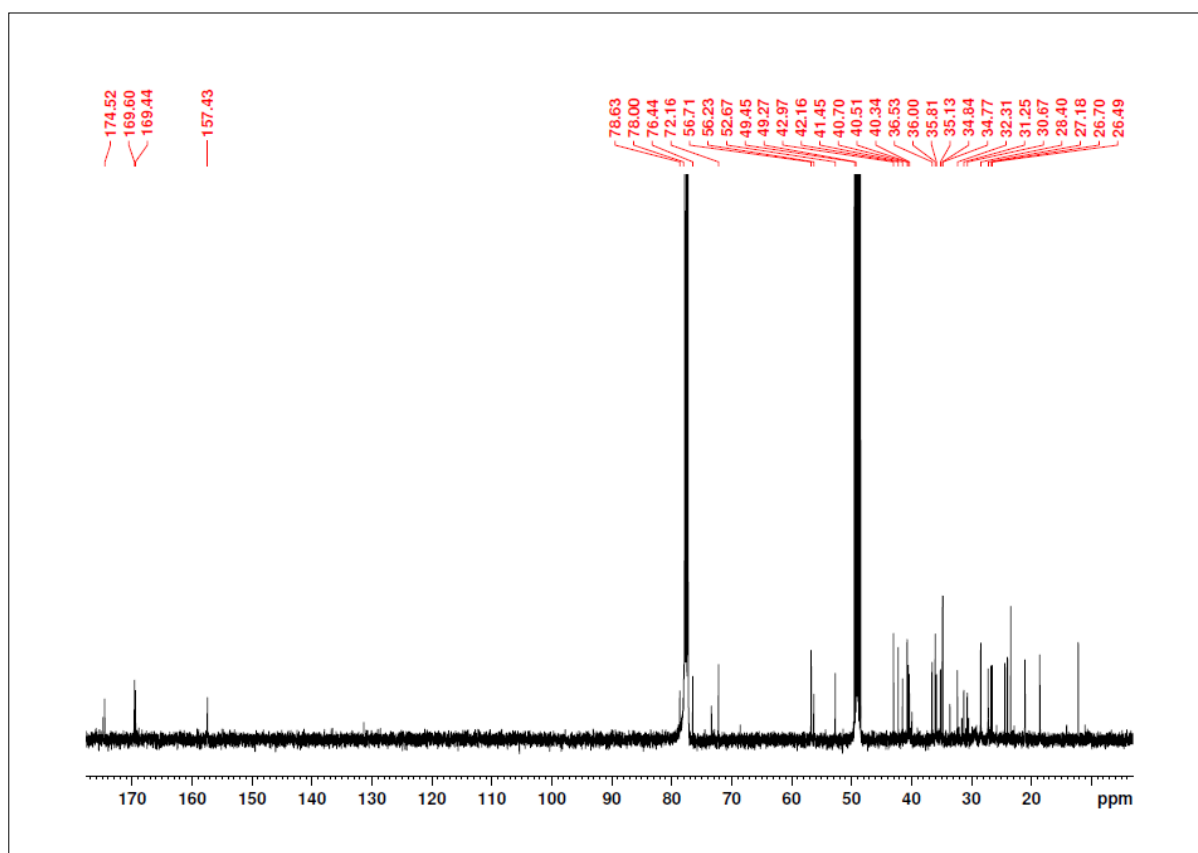
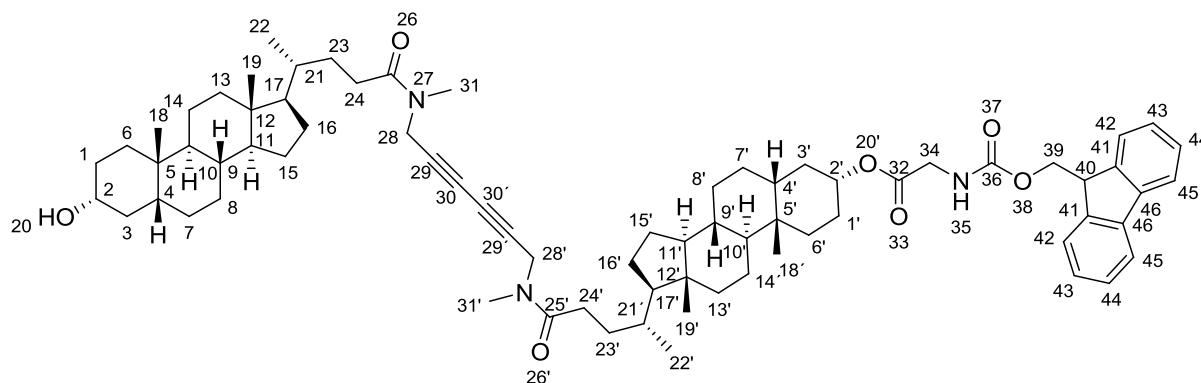


Abbildung 338: ¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄ = 1:1): Trifluoracetat-arginin-N-glycin-lithocholsäure-N-methylpropargylamid 94.

5.3.1.20 *N*-Fmoc-glycin-(lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-OH 190Ansatz:

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
71 (5.3.1.1)	427.66	1.0	0.585	0.250	
103 (5.3.1.12)	706.95	0.5	0.292	0.207	
CuCl	99.00	5.0	2.923	0.289	
TMEDA	116.20	5.0	2.923	0.337	0.441
CH ₂ Cl ₂					15.00

Durchführung:

0.25 g Lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid (**71**) (0.585 mmol, 1 eq.) und 0.207 g *N*-Fmoc-glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid **103** (0.292 mmol, 0.5 eq.) wurden in 15 mL Dichlormethan gelöst. Zu dieser Lösung wurden 0.289 g Kupfer(I)chlorid (2.923 mmol, 5 eq.) und 0.441 mL *N,N,N',N'*-Tetramethylethyldiamin (0.337 g, 2.923 mmol, 5 eq.) zugegeben. Es wurde solange bei Raumtemperatur gerührt, bis das Kupfer(I)chlorid vollständig in Lösung gegangen war. Hierbei färbte sich die Lösung hellgrün. Danach wurde die Atmosphäre über der Reaktionslösung mit Sauerstoff gesättigt. Die tiefblaue Lösung wurde weitere 15 h bei Raumtemperatur gerührt und der Reaktionsverlauf mittels DC überprüft. Nach vollständiger Umsetzung der Edukte wurde das Reaktionsgemisch auf 30 mL gesättigte Ammoniumchlorid-Lösung gegossen, die organische Phase abgetrennt und zwei weitere Male mit gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden mit Dichlormethan gegenextrahiert und die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet. Das Trocknungsmittel wurde abgetrennt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt. Die drei entstandenen Dimere wurden säulenchromatographisch getrennt. Zur Abtrennung von Spuren der Edukte wurde als mobile Phase *n*-Hexan : Ethylacetat = 2:1 verwendet. Danach wurde die Polarität der mobilen Phase er-

hört (*n*-Hexan : Ethylacetat = 1:1). Nach Abtrennung der beiden Dimere **95** und **194** wurde die Polarität nochmals erhöht (*n*-Hexan : Ethylacetat = 1:2), um Dimer **190** zu isolieren. Es konnten 0.135 g (0.119 mmol) des gewünschten Dimers **190** in Form eines farblosen, feinkristallinen Feststoffs isoliert werden.

Analytik:

Ausbeute: 41 %. **R_F:** 0.21 (*n*-Hexan : Ethylacetat = 1:1). **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ = 0.61 (s, 3H, H-19), 0.62 (s, 3H, H-19'), 0.89 (s, 3H, H-18), 0.90 (s, 3H, H-18'), 0.91 (d, ³J_{HH} = 6.22 Hz, 6H, H-22, H-22'), 0.95-0.98 (m, 2H, H-6, H-6'), 0.92-1.13 (m, 16H, H-7, H-7', H-8, H-8', H-11, H-11', H-13, H-13', H-14, H-14', H-15, H-15', H-16, H-16', H-17, H-17'), 1.15-1.67 (m, 16H, H-1, H-1', H-3, H-3', H-4, H-4', H-8, H-8', H-9, H-9', H-10, H-10', H-14, H-14', H-23, H-23'), 1.63-1.67 (m, 2H, H-15, H-15'), 1.69-1.77 (m, 2H, H-1, H-1'), 1.66-1.93 (m, 10H, H-3, H-3', H-6, H-6', H-7, H-7', H-16, H-16', H-21, H-21'), 1.93-1.96 (m, 2H, H-13, H-13'), 2.12-2.27 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.31-2.39 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.95 (s, 1H, H-31, H31'), 3.04 (s, 4H, H-31, H31'), 3.56-3.64 (m, 1H, H-2), 3.94 (d, ³J_{HH} = 5.24 Hz, 2H, H-34), 4.09 (m, 1.4H, H-28, H-28'), 4.23 (t, ³J_{HH} = 7.86 Hz, 1H, H-40), 4.27 (m, 2.6H, H-28, H-28'), 4.36 (d, ³J_{HH} = 7.86 Hz, 2H, H-39), 4.76-4.83 (m, 1H, H-2'), 5.48 (t, ³J_{HH} = 5.23 Hz, 1H, H-34), 7.28 (dd, ³J_{HH} = 7.76 Hz, ³J_{HH} = 7.76 Hz, 2H, H-42), 7.38 (t, ³J_{HH} = 7.76 Hz, 2H, H-43), 7.59 (d, ³J_{HH} = 7.76 Hz, 2H, H-41), 7.74 (d, ³J_{HH} = 7.76 Hz, 2H, H-44). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, CDCl₃): δ = 12.1 (C19, C19'), 18.4/18.5 (C22, C22'), 20.9 (C14, C14'), 23.4/23.5 (C18, C18'), 24.2/24.3 (C15, C15'), 26.3 (C8, C8'), 26.7 (C7, C7'), 27.3 (C16, C16'), 28.3 (C24, C24'), 30.3/30.5 (C1, C1'), 31.0 (C24, C24'), 31.3 (C23, C23'), 32.2 (C23, C23'), 33.6 (C31, C31'), 34.6 (C31, C31'), 34.7 (C5, C5'), 35.1 (C6, C6'), 35.7 (C21), 35.9 (C21'), 35.4 (C9), 35.6 (C9'), 35.7 (C28), 35.9 (C28), 36.5 (C3), 36.9 (C3'), 40.1 (C28, C28'), 40.2 (C13, C13'), 40.4 (C10, C10'), 41.9 (C4'), 42.2 (C4), 42.7 (C34), 43.1 (C12, C12'), 56.1 (C40), 56.4 (C17, C17'), 56.5 (C11, C11'), 67.2 (C30, C30'), 67.2 (C30, C30'), 67.3 (C39), 69.3 (C29, C29'), 75.9 (C2, C2'), 78.2 (C29, C29'), 120.1 (C44), 125.2 (C43), 127.1 (C45), 127.8 (C42), 156.4 (C36), 169.6 (C32), 173.4 (C25, C25'). **IR** (ATR): $\tilde{\nu}$ = 2931 (m), 2862 (m), 2238 (w), 1723 (m), 1643 (m), 1514 (w), 1448 (m), 1396 (m), 1335 (m), 1256 (m), 1199 (s), 1165 (m), 1116 (w), 1068 (m), 1047 (m), 1008 (m), 910 (m), 759 (m), 728 (s). **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für C₇₃H₁₀₂N₃O₇: m/z 1132.7712, gef.: m/z 1132.7760; ber. für C₇₃H₁₀₁N₃O₇Na: m/z 1154.7532, gef.: m/z 1154.7567.

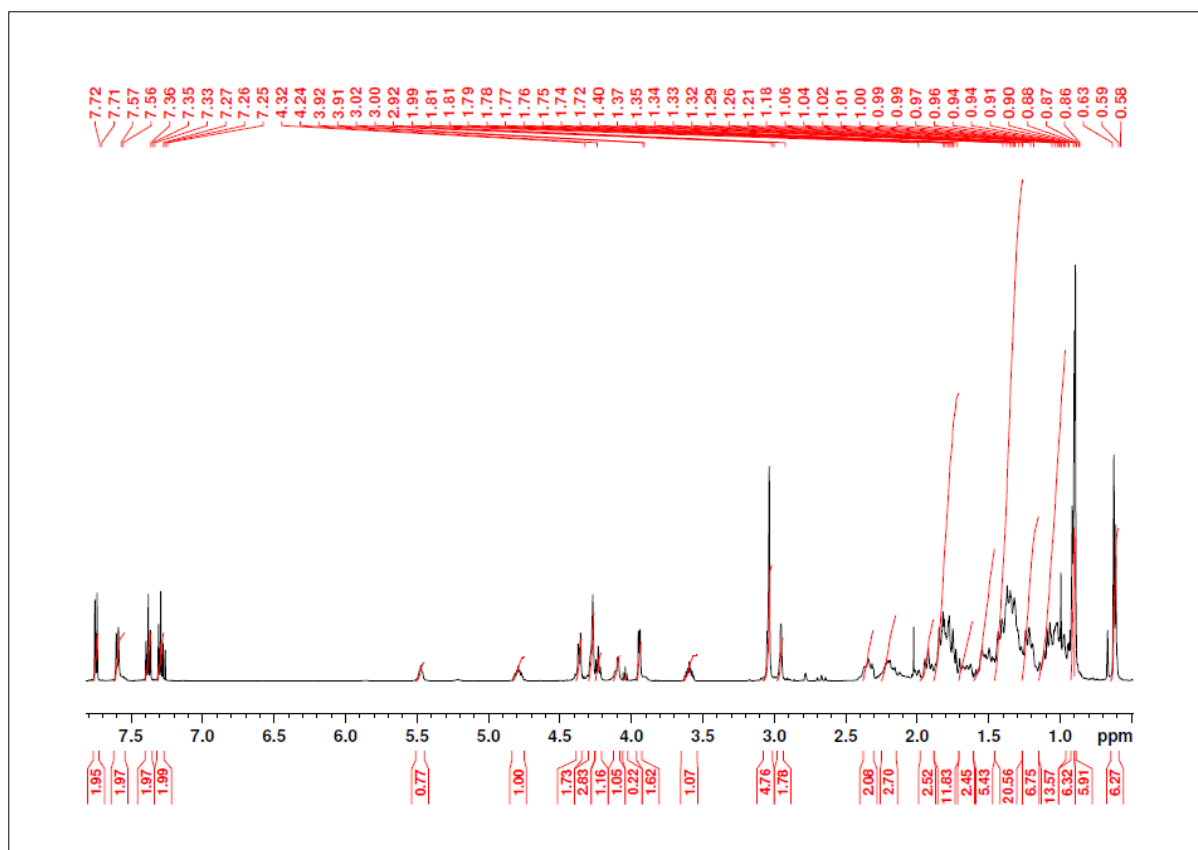


Abbildung 339: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): N-Fmoc-glycin-(lithocholsäure-N-methylpropargylamid-Dimer)-OH 190.

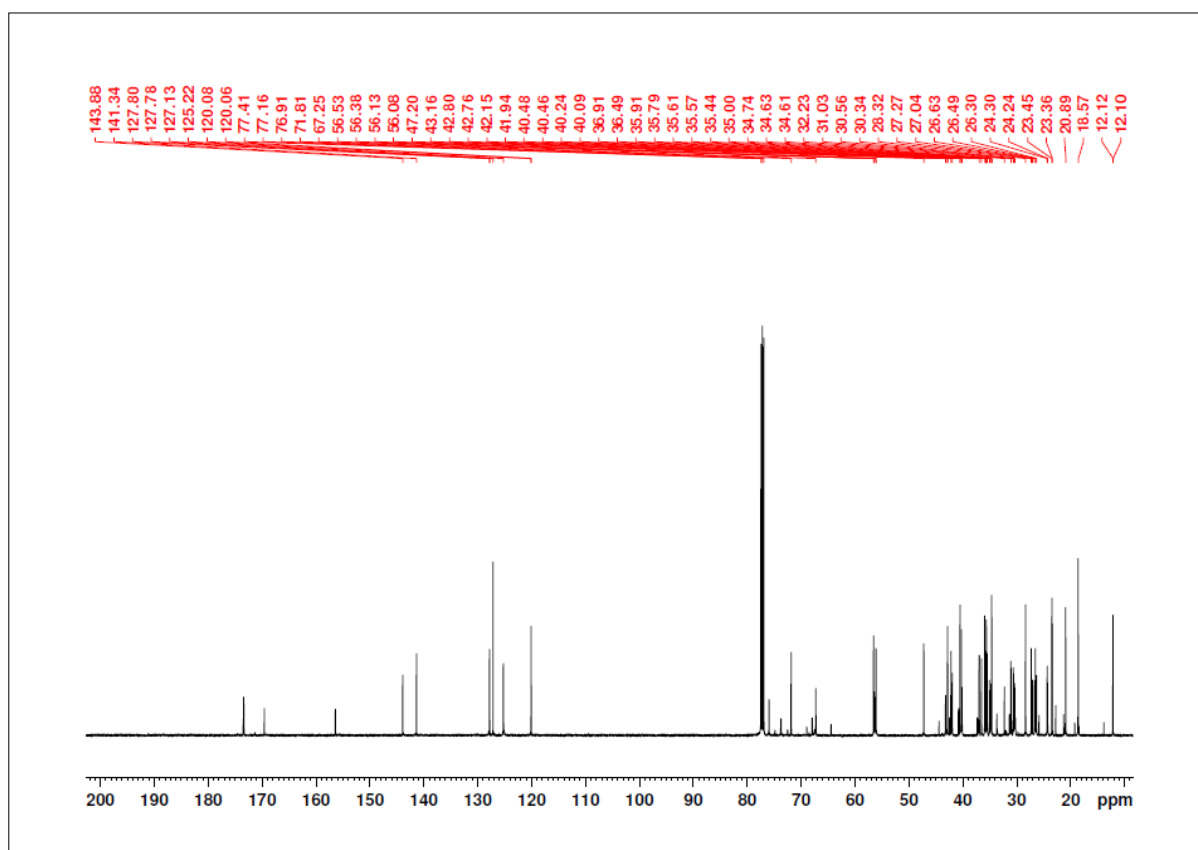
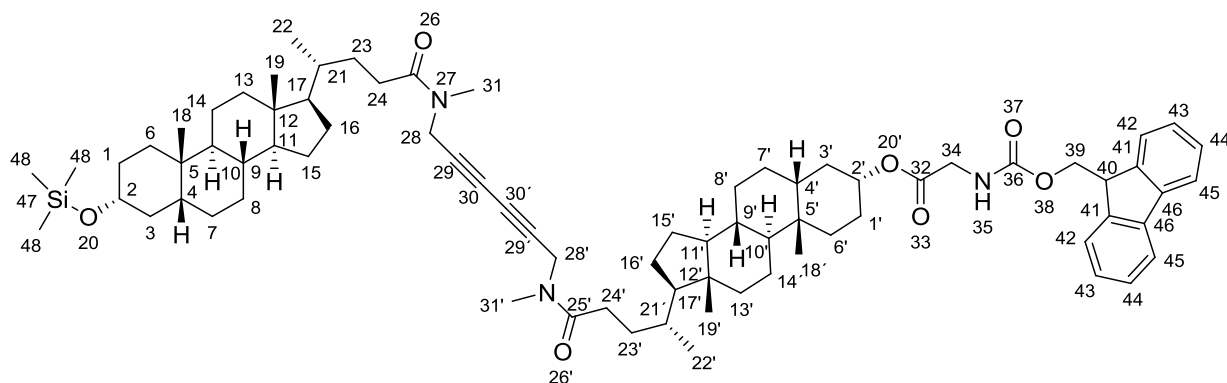


Abbildung 340: ¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃): N-Fmoc-glycin-(lithocholsäure-N-methylpropargylamid-Dimer)-OH 190.

5.3.1.21 *N*-Fmoc-glycin-(lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-OTMS 191



Ansatz:

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
190 (5.3.1.20)	1132.60	1.0	0.119	0.135	
Chlortrimethylsilan	108.64	3.0	0.358	0.038	0.05
DIEA	129.25	6.0	0.715	0.093	0.125
DCM					10.0

Durchführung:

0.135 g *Fmoc-N*-glycin-(lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-OH **190** (0.119 mmol, 1 eq.) und 0.05 mL Chlortrimethylsilan (0.038 g, 0.358 mmol, 3 eq.) wurden in 10 mL Dichlormethan gelöst. Diese Lösung wurden anschließend mit 0.125 mL DIEA (0.715 mmol, 0.093 g, 6 eq.) versetzt und bei RT gerührt. Der Reaktionsfortgang wurde mittels DC überprüft. Die Umsetzung war nach 6 h beendet. Das Reaktionsgemisch wurde mit 15 mL Dichlormethan verdünnt und die organische Phase mit 20 mL gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde abgetrennt und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der farblose Feststoff (0.2 g) im Ölpumpenvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wurde anschließend säulenchromatographisch gereinigt (*n*-Hexan : Ethylacetat = 2:1) und das Produkt im Ölpumpenvakuum getrocknet. Es konnten 0.140 g (0.117 mmol) eines farblosen, feinkristallinen Feststoffs isoliert werden.

Analytik:

Ausbeute: 98 %. **R_F:** 0.7 (*n*-Hexan : Ethylacetat = 1:1). **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ = 0.11 (s, 9H, H-48), 0.63 (s, 6H, H-19, H-19'), 0.90 (m, 3H, H-18), 0.91 (m, 3H, H-18'), 0.92 (d, ³J_{HH} = 6.24 Hz, 6H, H-22, H-22'), 0.96-0.99 (m, 2H, H-6, H-6'), 0.91-1.13 (m, 16H, H-7, H-7', H-8, H-8', H-11, H-11', H-13, H-13', H-14, H-14', H-15, H-15', H-16, H-16', H-17, H-17'), 1.29-1.50 (m, 16H, H-1, H-1', H-3, H-3', H-4, H-4', H-8, H-8', H-9, H-9', H-10, H-10', H-14, H-14', H-23, H-23'), 1.64-1.69 (m, 2H, H-15, H-15'), 1.70-1.76 (m, 2H, H-1, H-1'), 1.67-1.98 (m, 10H, H-3, H-3', H-6, H-6', H-7, H-7', H-16, H-16', H-21, H-21'), 1.93-1.96 (m, 2H, H-13, H-13'), 2.16-2.29 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.31-2.45 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.97 (s, 2H, H-31, H31'), 3.06 (s, 4H, H-31, H31'), 3.96 (d, ³J_{HH} = 5.17 Hz, 2H, H-34), 4.11 (s, 1.4H, H-28, H-28'), 4.15 (t, ³J_{HH} = 7.52 Hz, 1H, H-40), 4.29 (s, 2.6H, H-28, H-28'), 4.38 (d, ³J_{HH} = 7.32 Hz, 2H, H-39), 4.76-4.88 (m, 2H, H-2, H-2'), 5.32 (t, ³J_{HH} = 5.23 Hz, 1H, H-34), 7.31 (dd, ³J_{HH} = 7.63 Hz, ³J_{HH} = 7.63 Hz, 2H, H-42), 7.40 (dd, ³J_{HH} = 7.63 Hz, ³J_{HH} = 7.63 Hz, 2H, H-43), 7.60 (d, ³J_{HH} = 7.63 Hz, 2H, H-41), 7.76 (d, ³J_{HH} = 7.63 Hz, 2H, H-44). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, CDCl₃): δ = 0.4 (C48), 12.2 (C19, C19'), 18.6 (C22, C22'), 21.3 (C14, C14'), 23.5 (C18, C18'), 24.4 (C15, C15'), 26.4 (C8, C8'), 26.8 (C7, C7'), 27.1 (C16, C16'), 28.4 (C24, C24'), 30.6 (C1, C1'), 31.2 (C24, C24'), 31.5 (C23, C23'), 32.4 (C23, C23'), 33.6 (C31, C31'), 34.6 (C31, C31'), 34.8 (C5, C5'), 35.2 (C6, C6'), 35.8 (C21, C21'), 35.7 (C9, C9'), 36.0 (C28, C28'), 36.4 (C3, C3'), 39.7 (C28, C28'), 40.4 (C13, C13'), 40.7 (C10, C10'), 42.1 (C4, C4'), 42.9 (C34), 43.0 (C12, C12'), 56.2 (C40), 56.4 (C17, C17'), 56.7 (C11, C11'), 67.4 (C39), 71.8 (C30, C30'), 72.9 (C30, C30'), 75.9 (C2, C2'), 78.5 (C29, C29'), 79.2 (C29, C29'), 120.2 (C44), 125.3 (C43), 127.2 (C45), 127.9 (C42), 156.5 (C36), 169.7 (C32), 173.6 (C25, C25'). **IR** (ATR): $\tilde{\nu}$ = 2927 (m), 2861 (m), 2240 (w), 1722 (m), 1643 (m), 1516 (w), 1447 (m), 1397 (m), 1335 (m), 1253 (m), 1199 (s), 1161 (m), 1113 (w), 1070 (m), 1046 (m), 1010 (m), 911 (m), 759 (m), 728 (s), 625 (s). **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für C₇₃H₁₀₀N₃O₇Na (M⁺-TMS+Na⁺): m/z 1154.7583, gef.: m/z 1154.7622.

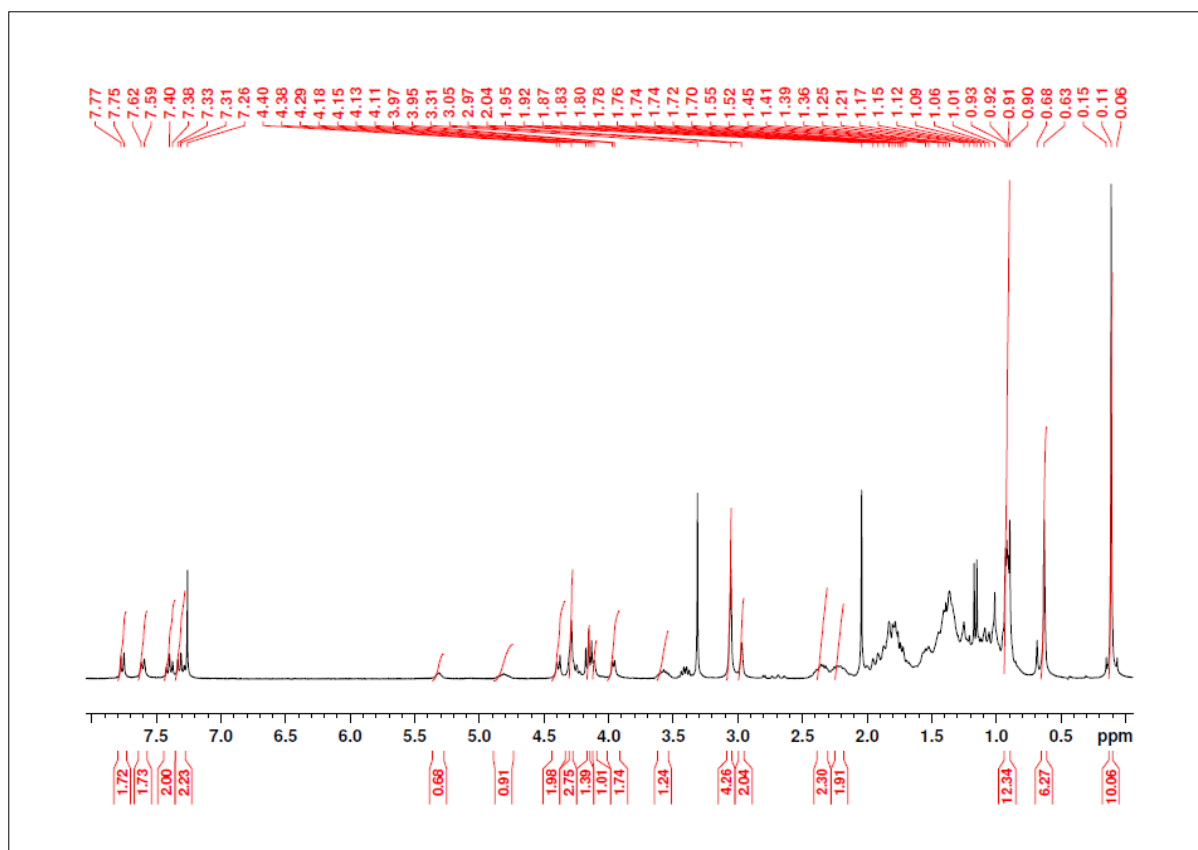


Abbildung 341: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): N-Fmoc-glycin-(lithocholsäure-N-methylpropargylamid-Dimer)-OTMS 191.

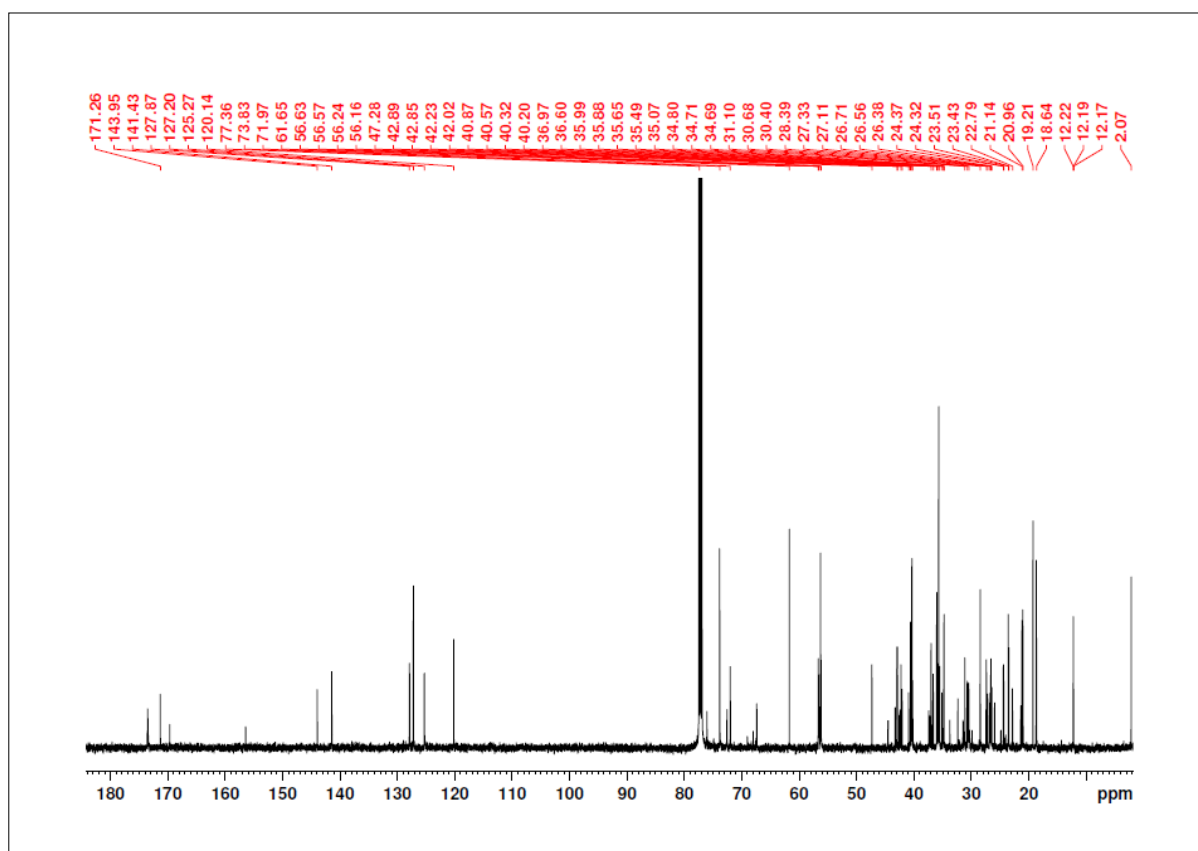
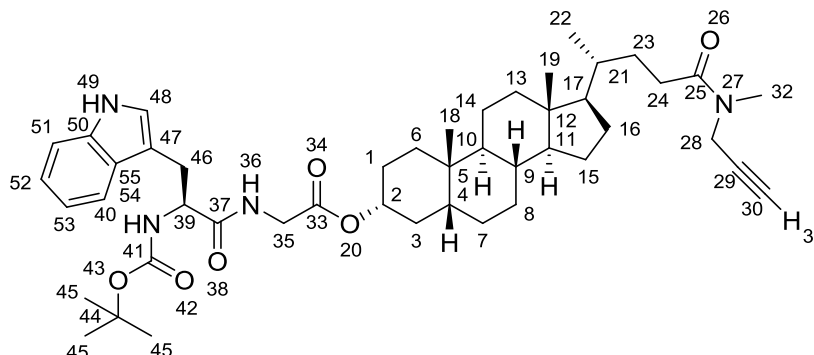


Abbildung 342: ¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃): N-Fmoc-glycin-(lithocholsäure-N-methylpropargylamid-Dimer)-OTMS 191.

5.3.2 Synthese der Rezeptoren 66 und 83 mit Tryptophan-Donor-Einheit

5.3.2.1 *N*-Boc-tryptophan-*N*-glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid 86



Ansatz:

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
<i>N</i> -Boc-tryptophan-OH	304.34	1.5	0.276	0.084	
73 (5.3.1.3)	598.73	1.0	0.184	0.110	
HCTU	413.69	1.2	0.221	0.091	
Cl-HOBt	169.57	2.5	0.459	0.078	
DIEA	129.25	6.0	1.102	0.142	0.192
CH ₂ Cl ₂					20.0
DMF					15.0

Durchführung:

0.084 g *N*-Boc-tryptophan-OH (0.276 mmol, 1.5 eq.) wurden in 30 mL eines 2 : 1-Gemisches aus Dichlormethan und *N,N'*-Dimethylformamid gelöst. Die Lösung wurde im Eisbad auf 0 °C gekühlt und mit 0.091 g HCTU (0.221 mmol, 1.2 eq.) und 0.078 g Cl-HOBt (0.456 mmol, 2.5 eq.) versetzt. Nachdem sich eine klare Lösung gebildet hatte, wurden 0.192 mL DIEA (0.142 g, 1.102 mmol, 6 eq.) zugegeben und das gelbe Gemisch für 10 min bei 0 °C gerührt. Nach Zugabe von 0.110 g Trifluoracetat-glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid **73** (0.184 mmol, 1.0 eq.), gelöst in 5 mL DMF, wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmt und für weitere 24 h gerührt. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels DC überprüft. Die Reaktionslösung wurde mit 30 mL Dichlormethan verdünnt. Die organische Phase wurde mit je 30 mL gesättigter NaHCO₃-Lösung, 1 M Salzsäure, und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden mit Dichlormethan gegenextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das gelbliche Rohprodukt wurde im Ölpumpenvakuum ge-

trocknet und anschließend säulenchromatographisch gereinigt (*n*-Hexan : Ethylacetat = 1:1). Es wurden 0.101 g (0.129 mmol) eines feinkristallinen, farblosen Feststoffs isoliert.

Analytik:

Ausbeute: 71 %. **R_F:** 0.28 (*n*-Hexan : Ethylacetat = 1:1). **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ = 0.62 (s, 3H, H-18), 0.82-0.87 (m, 1H, H-6), 0.89 (s, 3H, H-19), 0.91 (d, ³J_{HH} = 6.07 Hz, 3H, H-22), 0.95-1.03 (m, 8H, H-7, H-8, H-11, H-13, H-14, H-15, H-16, H-17), 1.15-1.33 (m, 8H, H-1, H-4, H-8, H-9, H-10, H-14, H-23), 1.25-1.29 (m, 1H, H-3), 1.31-1.35 (m, 1H, H-15), 1.40-1.43 (m, 1H, H-1), 1.40 (s, 9H, H-45), 1.41-1.81 (m, 5H, H-3, H-6, H-7, H-16, H-21), 1.90-1.93 (m, 1H, H-13), 2.19-2.30 (m, 1H, H-24), 2.20 (t, ³J_{HH} = 2.09 Hz, 0.7H, H-31), 2.32 (t, ³J_{HH} = 2.09 Hz, 0.3H, H-31), 2.31-2.45 (m, 1H, H-24), 2.98 (s, 1H, H-32), 3.06 (s, 2H, H-32), 3.16-3.36 (m, 2H, H-35), 3.86 (dd, ³J_{HH} = 5.90 Hz, ²J_{HH} = 13.04 Hz, 1H, H-46), 3.92 (dd, ³J_{HH} = 5.90 Hz, ²J_{HH} = 13.04 Hz, 1H, H-46), 4.04 (s, 0.7H, H-28), 4.21 (s, 1.3H, H-28), 4.41- 4.46 (m, 1H, H-39), 4.63-4.77 (m, 1H, H-2), 5.19 (bs, 1H, H-40), 6.49 (t, ³J_{HH} = 4.39 Hz, 1H, H-36), 7.08 (t, ³J_{HH} = 7.11 Hz, 1H, H-52), 7.15 (t, ³J_{HH} = 7.11 Hz, 1H, H-53), 7.32 (s, 1H, H-48), 7.60 (d, ³J_{HH} = 7.64 Hz, 1H, H-51), 8.61 (d, ³J_{HH} = 7.91 Hz, 1H, H-54). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, CDCl₃): δ = 12.1 (C19), 18.6 (C22), 20.9 (C14), 23.4 (C18), 24.3 (C15), 26.4 (C8), 26.6 (C7), 27.1 (C16), 28.3 (C45), 30.2/30.4/30.7/31.1/31.2 (C1, C23, C24), 28.4 (C44), 32.2 (C23), 33.4 (C31), 34.5 (C28), 34.6 (C5), 35.0 (C6), 35.6 (C21), 35.9 (C9), 36.3 (C3), 39.5 (C28), 40.2 (C13), 40.5 (C10), 41.7 (C46), 42.0 (C4), 42.1 (C35), 42.8 (C12), 54.5 (C39), 56.1 (C17), 56.5 (C11), 71.8 (C36), 72.8 (C29), 75.8 (C2), 80.1 (C44), 111.4 (C54), 118.8 (C51), 119.6 (C52), 122.1 (C48), 123.4 (C53), 127.6 (C50), 136.3 (C55), 155.6 (C41), 169.0 (C33), 172.2 (C37), 173.5 (C25), 173.7 (C25). **IR** (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3510 (w), 2927 (m), 2865 (m), 2360 (w), 1706 (m), 1633 (s), 1494 (s), 1456 (s), 1382 (m), 1364 (s), 1247 (m), 1200 (s), 1165 (s), 1094 (m), 1064 (m), 1019 (m), 982 (m), 913 (m), 858 (m), 738 (s), 762 (s). **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für C₄₆H₆₆N₄O₆Na: m/z 793.4875, gef.: m/z 793.4879.

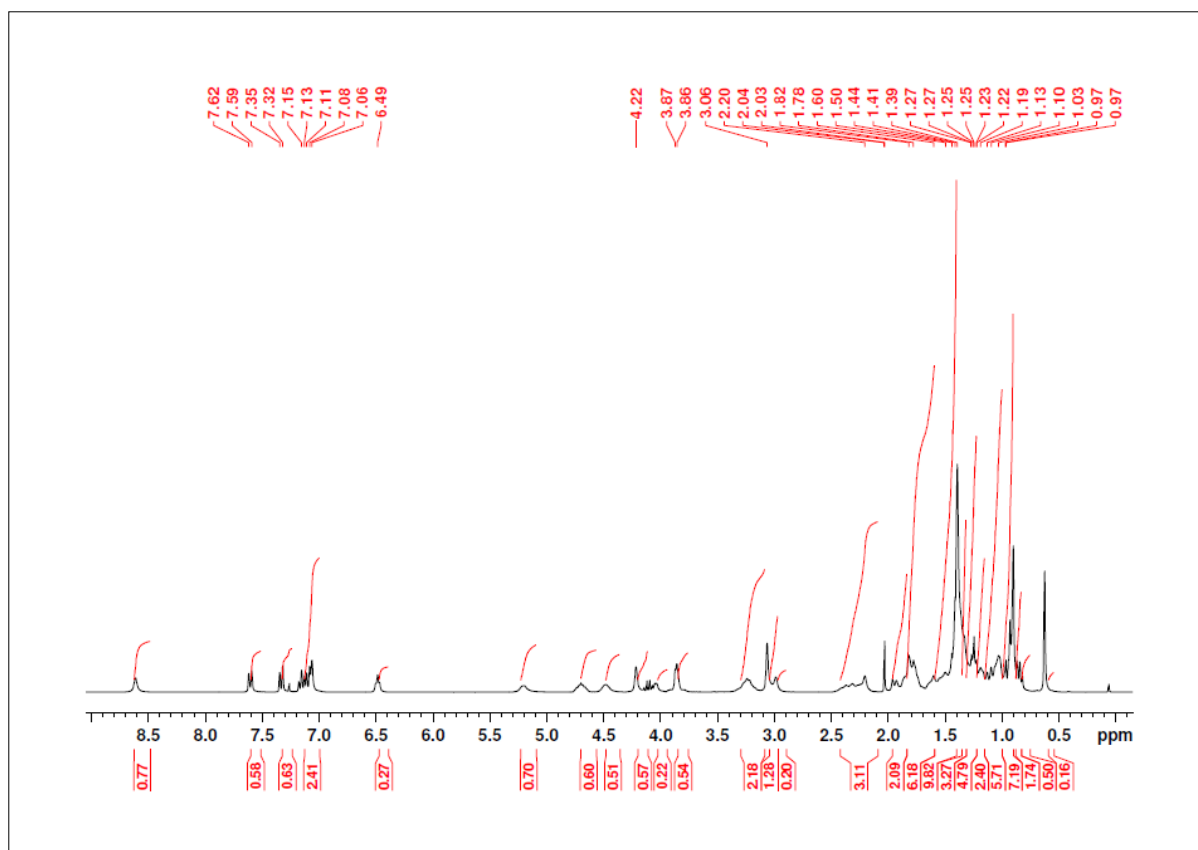


Abbildung 343: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): *N*-Boc-tryptophan-*N*-glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid 86.

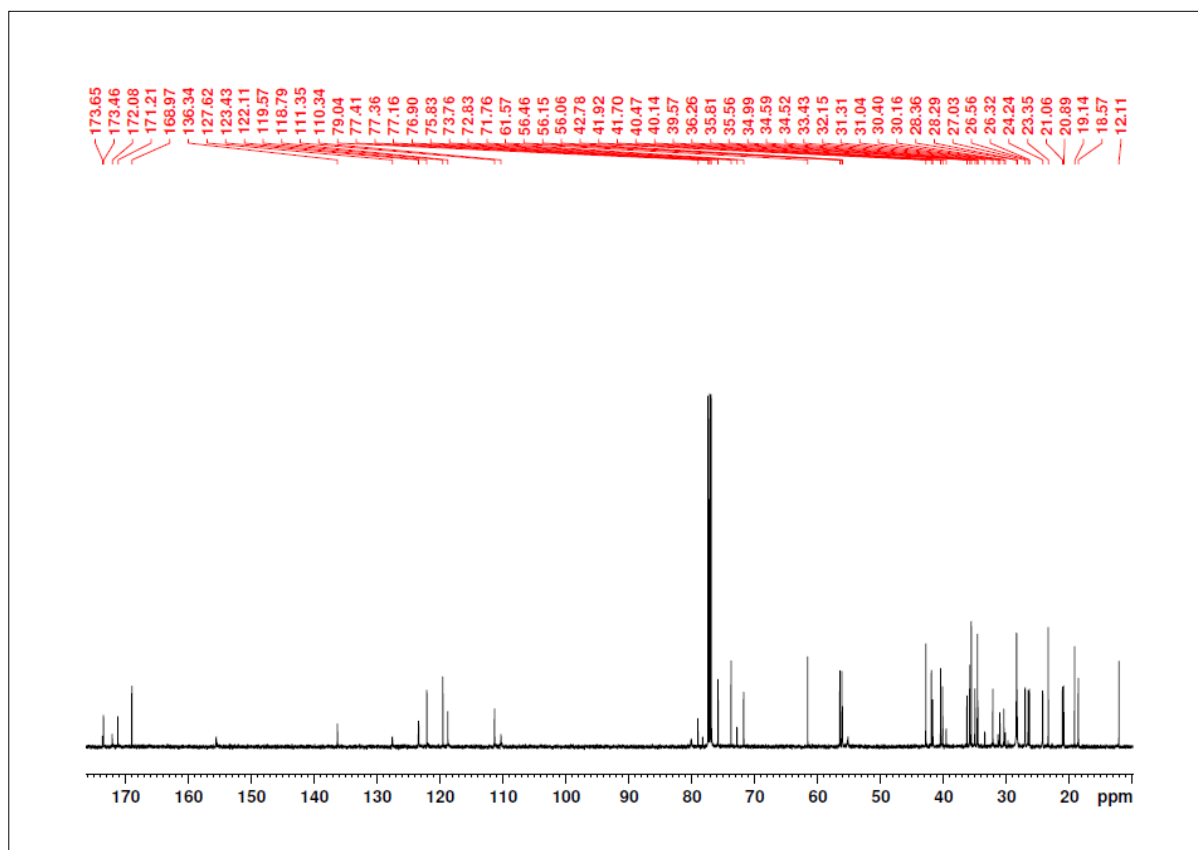
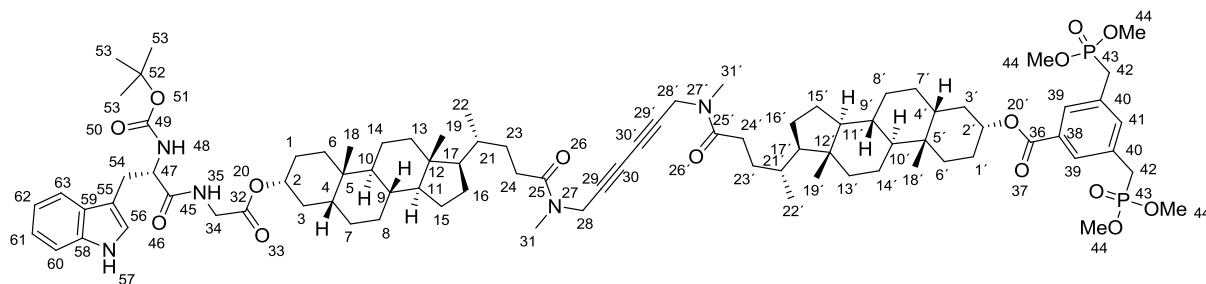


Abbildung 344: ¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃): *N*-Boc-tryptophan-*N*-glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid 86.

5.3.2.2 *N*-Boc-tryptophan-*N*-glycin-(lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-BP 80



Ansatz:

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
<i>N</i> -Boc-tryptophan-OH	304.34	3.0	0.157	0.048	
65 (5.3.1.10)	1372.61	1.0	0.053	0.072	
HCTU	413.69	3.0	0.157	0.065	
Cl-HOBt	169.57	5.0	0.262	0.045	
DIEA	129.25	30.0	1.574	0.203	0.274
CH ₂ Cl ₂					20.0
DMF					15.0

Durchführung:

0.048 g *N*-Boc-tryptophan-OH (0.157 mmol, 3.0 eq.) wurden in 30 mL eines 2 : 1-Gemisches aus absolutem Dichlormethan und *N,N'*-Dimethylformamid gelöst. Die Lösung wurde im Eisbad auf 0 °C gekühlt und mit 0.065 g HCTU (0.157 mmol, 3 eq.) und 0.045 g Cl-HOBt (0.262 mmol, 5 eq.) versetzt. Nachdem sich eine klare Lösung gebildet hatte, wurden 0.274 mL DIEA (0.203 g, 1.574 mmol, 30 eq.) zugegeben und das gelbe Gemisch für 10 min bei 0 °C gerührt. Nach Zugabe von 0.072 g Trifluoracetat-glycin-(lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid)-Dimer-BP **65** (0.053 mmol, 1.0 eq.), gelöst in 5 mL DMF, wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmt und für weitere 24 h gerührt. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels DC überprüft. Die Reaktionslösung wurde mit 30 mL Dichlormethan verdünnt. Die organische Phase wurde mit je 60 mL gesättigter NaHCO₃-Lösung, 1 M Salzsäure, und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden mit Dichlormethan gegenextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das gelbliche Rohprodukt wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet und anschließend säulenchromatographisch gereinigt (Dichlormethan : Methanol = 19:1). Es wurden 0.070 g (0.046 mmol) eines feinkristallinen, farblosen Feststoffs isoliert.

Analytik:

Ausbeute: 87 %. **R_F:** 0.73 (Dichlormethan : Methanol = 19:1). **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ = 0.63-0.65 (m, 6H, H-19, H-19'), 0.91-0.95 (m, 12H, H-18, H-18', H-22, H-22'), 0.98-2.02 (m, 52H), 1.64 (s, 9H, H-53), 2.17-2.29 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.30-2.38 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.95 (s, 2H, H-31, H-31'), 3.05 (s, 4H, H-31, H-31'), 3.17 (m, 2H, H-34), 3.19 (d, $^2J_{PH}$ = 21.9 Hz, 4H, H-42), 3.68 (d, $^2J_{PH}$ = 10.8 Hz, 12H, H-44), 3.83-3.95 (m, 2H, H-54), 4.10 (m, 1.2H, H-28, H-28'), 4.28 (m, 2.8H, H-28, H-28'), 4.48 (m, 1H, H-47), 4.69-4.74 (m, 1H, H-2), 4.92-4.96 (m, 1H, H-2'), 5.16 (m, 1H, H-48), 6.47 (t, $^3J_{HH}$ = 4.39 Hz, 1H, H-35), 7.21 (dd, $^3J_{HH}$ = 7.71 Hz, $^3J_{HH}$ = 7.82 Hz, 1H, H-62), 7.24 (dd, $^3J_{HH}$ = 7.71 Hz, $^3J_{HH}$ = 7.82 Hz, 1H, H-61), 7.44 (s, 1H, H-56), 7.45 (s, 1H, H-41), 7.57 (d, $^3J_{HH}$ = 7.74 Hz, 1H, H-63), 7.84 (d, $^3J_{HH}$ = 1.90 Hz, 2H, H-39), 8.11 (d, $^3J_{HH}$ = 7.41 Hz, 1H, H-60). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, CDCl₃): δ = 12.2 (C19, C19'), 18.6 (C22, C22'), 20.9/21.0 (C14, C14'), 23.4/23.5 (C18, C18'), 24.3 (C15, C15'), 26.4 (C8, C8'), 26.6/26.8 (C7, C7'), 27.0/27.1 (C16, C16'), 28.4 (C53), 30.3/30.4/30.6/31.1/31.4 (C1, C1', C24, C24', C23, C23'), 32.1 (C42), 32.2/32.4 (C23, C23'), 33.2 (d, $^1J_{PC}$ = 115.3 Hz, C42), 33.6/33.7 (C31, C31'), 34.7 (C5, C5'), 35.0/35.2 (C6, C6'), 35.6 (C21, C21'), 35.9 (C9, C9'), 36.9 (C3, C3'), 38.7 (C28, C28'), 40.2 (C13, C13'), 40.3 (C28, C28'), 40.5/40.6 (C10, C10'), 41.7 (C54), 42.0 (C4, C4'), 42.1 (C34), 42.8/42.9 (C12, C12'), 53.1 (d, $^2J_{PC}$ = 6.8 Hz, C44), 53.5 (C47), 56.2/56.3 (C17, C17'), 56.5 (C11, C11'), 67.9 (C30, C30'), 73.8 (C29, C29'), 75.5 (C2'), 76.0 (C2), 85.2 (C52), 115.4 (C60), 115.6 (C55), 119.1 (C63), 122.7 (C62), 124.4 (C56), 124.7 (C61), 129.7 (C39), 130.4 (C59), 131.9 (C38), 132.2 (C40), 135.3 (C41), 135.6 (C58), 155.5 (C49), 165.6 (C36), 168.9 (C32), 171.5 (C45), 173.4 (C25, C25'). **³¹P-NMR** (202.3 MHz, CDCl₃): δ = 28.02. **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für C₈₇H₁₂₇N₅O₁₅P₂Na: m/z 1566.8702, gef.: m/z 1566.8694.

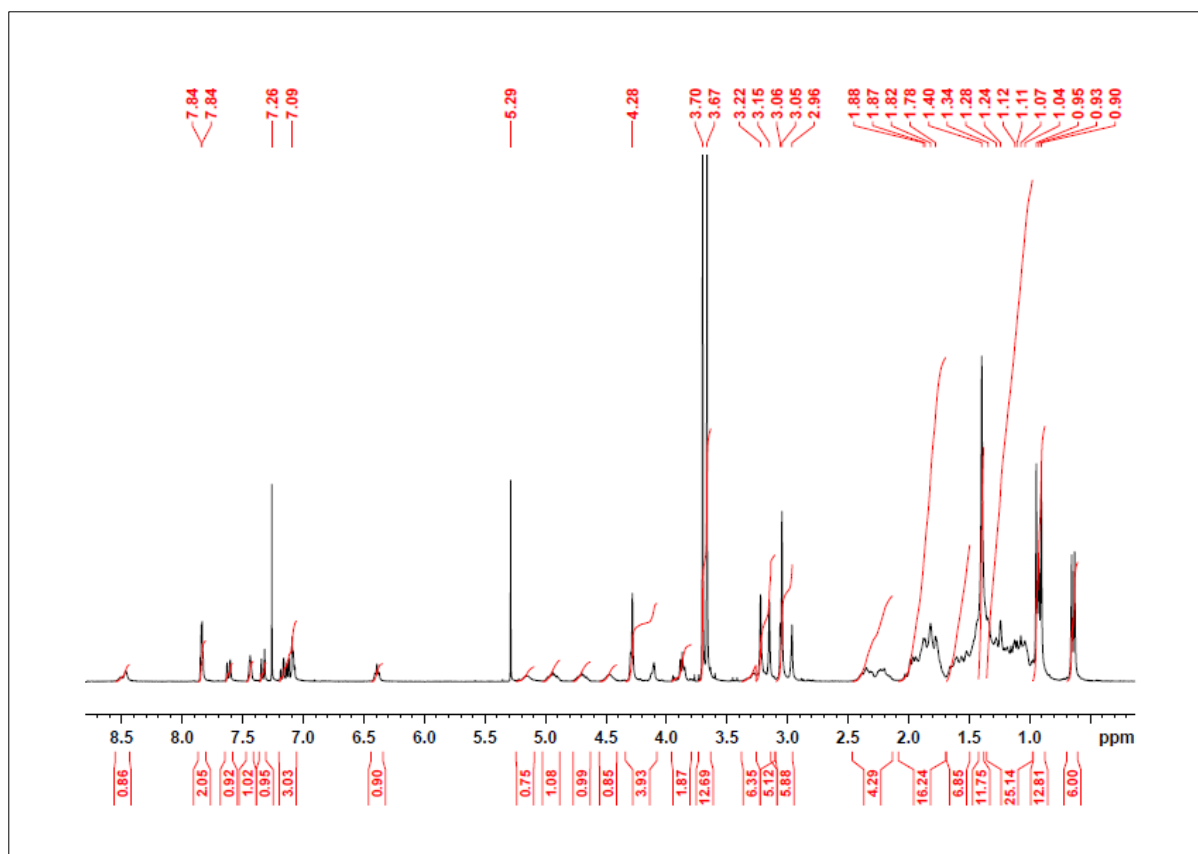


Abbildung 345: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): N-Boc-tryptophan-N-glycin-(lithocholsäure-N-methylpropargylamid-Dimer)-BP 80.

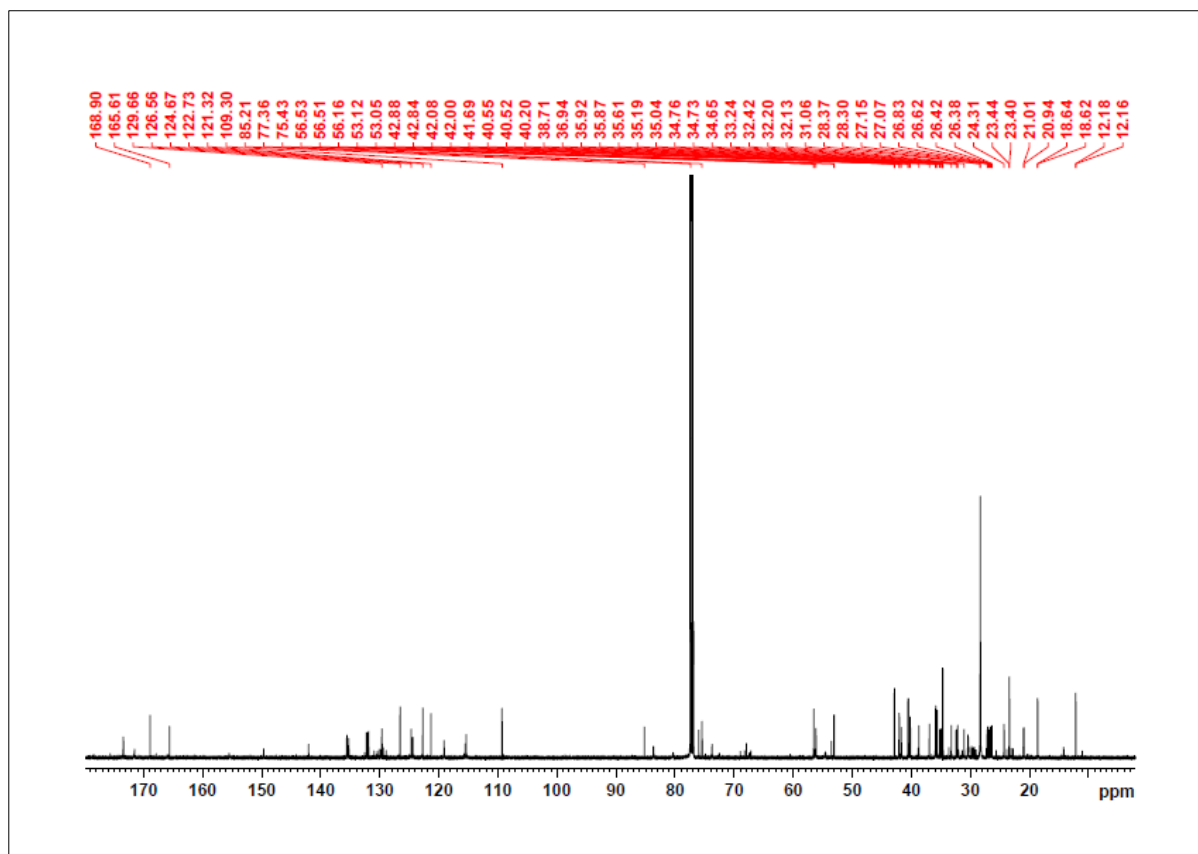
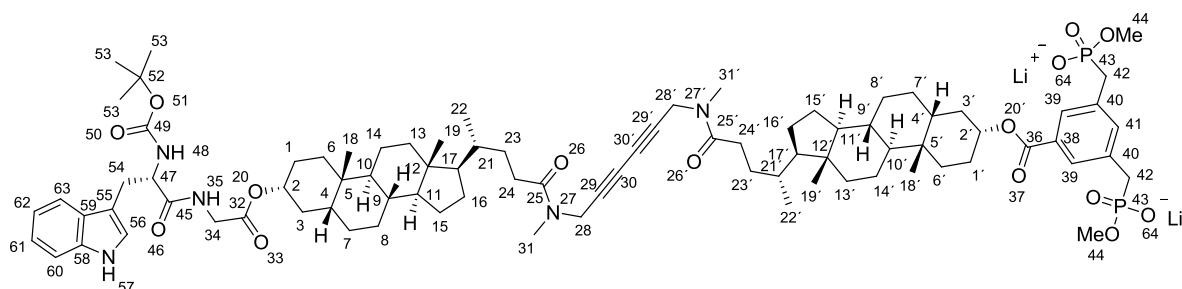


Abbildung 346: ¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃): N-Boc-tryptophan-N-glycin-(lithocholsäure-N-methylpropargylamid-Dimer)-BP 80.

5.3.2.3 *N*-Boc-tryptophan-*N*-glycin-(lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-BP(OLi)₂ 66



Ansatz:

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
80 (5.3.2.2)	1541.91	1.0	0.032	0.05	
LiBr	86.84	2.5	0.081	0.007	
CH ₃ CN					15.0

Durchführung:

0.05 g *N*-Boc-tryptophan-*N*-glycin-(lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-BP 80 (0.032 mmol, 1 eq.) wurden in 15 mL Acetonitril gelöst und mit 0.007 g wasserfreiem LiBr (0.081 mmol, 2.5 eq.) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 24 h unter Rückfluss erhitzt. Dabei fiel das Produkt als farbloser Feststoff aus. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels DC überprüft. Nach vollständiger Umsetzung des Edukts wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur gekühlt und der Feststoff samt Reaktionslösung in ein Zentrifugenglas überführt. Der erhaltene Feststoff wurde abgetrennt und vier Mal mit je 10 mL Acetonitril gewaschen. Das farblose Produkt (0.05 g, 0.031 mmol) wurde im Hochvakuum getrocknet.

Analytik:

Ausbeute: 97 %. **Schmp.:** >300 °C. **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄ = 1:1): δ = 0.51-0.53 (m, 6H, H-19, H-19'), 0.79-0.83 (m, 12H, H-18, H-18', H-22, H-22'), 0.87-1.89 (m, 52H), 1.52 (s, 9H, H-53), 2.06-2.18 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.21-2.33 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.83 (s, 2H, H-31, H-31'), 2.86 (d, ²J_{PH} = 21.9 Hz, 4H, H-42), 2.95 (m, 4H, H-31, H-31'), 3.42 (d, ²J_{PH} = 10.8 Hz, 12H, H-44), 3.77 (s, 2H, H-34), 4.02 (m, 1.2H, H-28, H-28'), 4.14 (m, 2.8H, H-28, H-28'), 4.03-4.15 (m, 2H, H-54), 4.32 (m, 1H, H-47), 4.57-4.65 (m, 1H, H-2), 4.73-4.81 (m, 1H, H-2'), 7.10 (t, ³J_{HH} = 7.37 Hz, 1H, H-62), 7.17 (t, ³J_{HH} = 7.38 Hz, 1H, H-61), 7.34 (s, 1H, H-56), 7.57 (d, ³J_{HH} = 7.82 Hz, 1H, H-63), 7.49 (s, 1H, H-41), 7.84 (s, 2H, H-39), 7.96 (d, ³J_{HH} = 7.41 Hz, 1H, H-60). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄ = 1:1): δ = 12.4 (C19, C19'), 18.9 (C22, C22'), 21.3/21.4 (C14, C14'), 23.8/23.9 (C18, C18'), 24.7 (C15, C15'), 26.7 (C8, C8'), 27.0/27.2 (C7, C7'), 27.4/27.5 (C16, C16'), 28.7 (C53), 30.7/30.8/31.0/31.5/31.9 (C1, C1', C24, C24', C23, C23'), 32.5 (C42), 32.6/32.8 (C23, C23'), 33.6 (d, ¹J_{PC} = 115.3 Hz, C42), 33.9/34.0 (C31, C31'), 35.1 (C5, C5'), 35.4/35.6 (C6, C6'), 36.0 (C21, C21'), 36.3 (C9, C9'), 37.3 (C3, C3'), 39.1 (C28, C28'), 40.6 (C13, C13'), 40.7 (C28, C28'), 40.8/40.8 (C10, C10'), 42.1 (C54), 42.4 (C4, C4'), 42.5 (C34), 43.2/43.3 (C12, C12'), 53.5 (d, ²J_{PC} = 6.8 Hz, C44), 53.9 (C47), 56.6/56.7 (C17, C17'), 56.9 (C11, C11'), 68.3 (C30, C30'), 74.2 (C29, C29'), 75.9 (C2'), 76.4 (C2), 85.6 (C52), 115.8 (C60), 115.9 (C55), 119.5 (C63), 123.1 (C62), 124.7 (C56), 125.1 (C61), 130.1 (C39), 130.8 (C59), 132.3 (C38), 132.6 (C40), 135.7 (C41), 135.9 (C58), 155.9 (C49), 165.69 (C36), 169.3 (C32), 171.9 (C45), 173.8 (C25, C25'). **³¹P-NMR** (202.3 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄ = 1:1): δ = 22.02. **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für C₈₇H₁₂₇N₅O₁₅P₂Na: m/z 1566.8702, gef.: m/z 1566.8694.

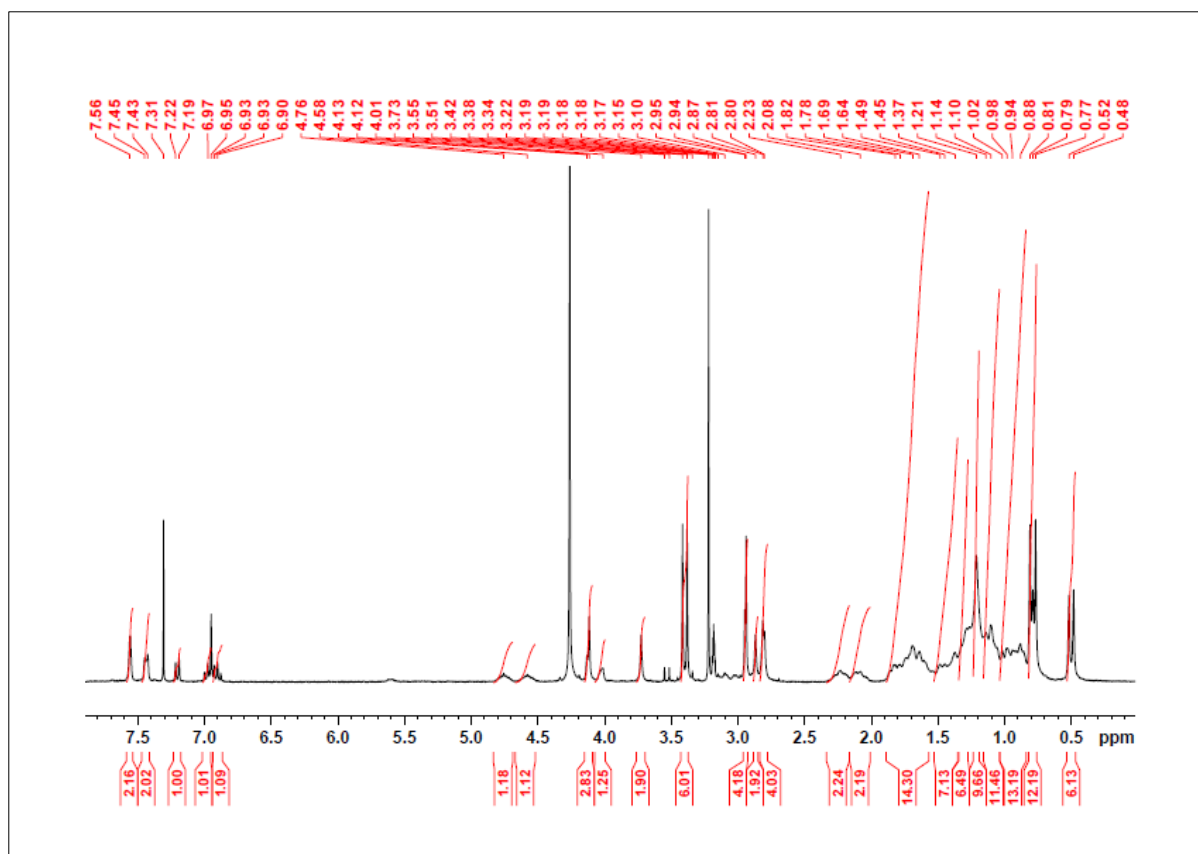


Abbildung 347: ^1H -NMR (500 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}-d_4 = 1:1$): *N*-Boc-tryptophan-*N*-glycin-(lithocholsäure-*N*-methyl-propargylamid-Dimer)-BP(OLi) $_2$ 66.

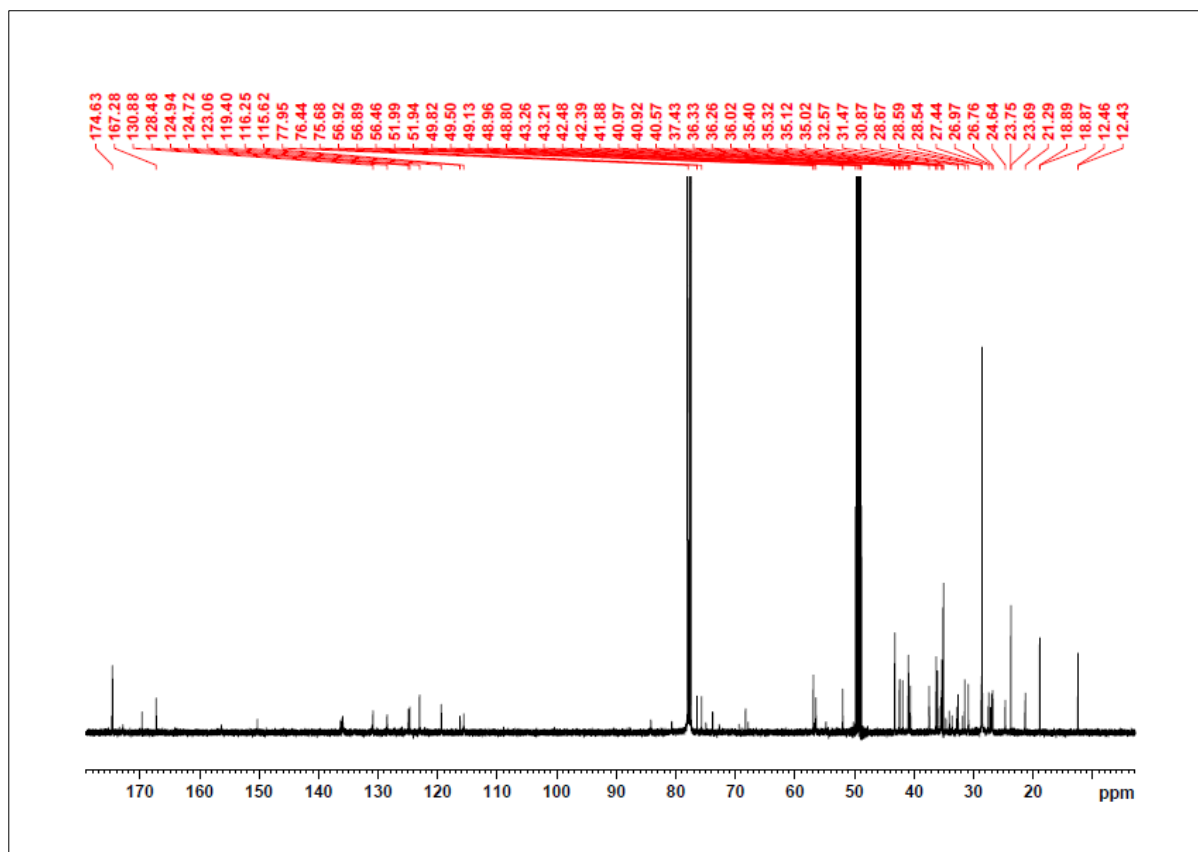
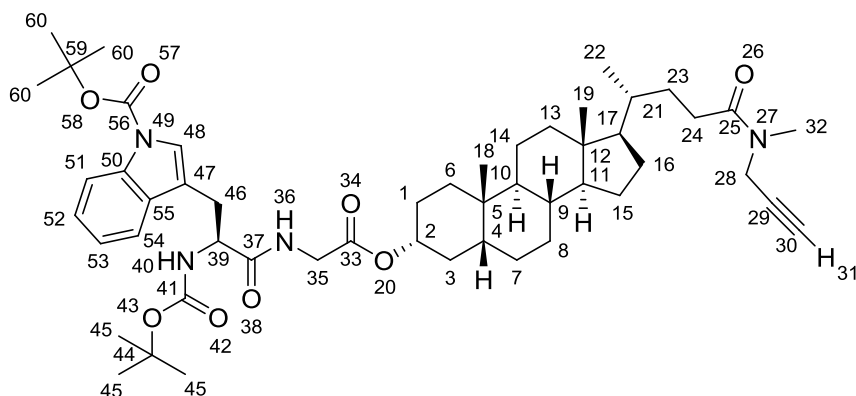


Abbildung 348: ^{13}C -NMR (125.7 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}-d_4 = 1:1$): *N*-Boc-tryptophan-*N*-glycin-(lithocholsäure-*N*-methyl-propargylamid-Dimer)-BP(OLi) $_2$ 66.

5.3.2.4 *N*-Boc-tryptophan(Boc)-*N*-glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid **192**



Ansatz:

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
<i>N</i> -Boc-tryptophan(Boc)-OH	404.46	1.5	0.276	0.112	
73 (5.3.1.3)	598.73	1.0	0.184	0.11	
HCTU	413.69	1.2	0.221	0.091	
Cl-HOBt	169.57	2.5	0.459	0.078	
DIEA	129.25	6.0	1.102	0.143	0.192
CH ₂ Cl ₂					10.0
DMF					10.0

Durchführung:

0.112 g *N*-Boc-tryptophan(Boc)-OH (0.276 mmol, 1.5 eq.) wurden in 15 mL eines 2 : 1-Gemisches aus Dichlormethan und *N,N'*-Dimethylformamid gelöst. Die Lösung wurde im Eisbad auf 0 °C gekühlt und mit 0.091 g HCTU (0.221 mmol, 1.2 eq.) und 0.078 g Cl-HOBt (0.459 mmol, 2.5 eq.) versetzt. Nachdem sich eine klare Lösung gebildet hatte, wurden 0.096 mL DIEA (0.072 g, 0.551 mmol, 3 eq.) zugegeben und das gelbe Gemisch für 10 min bei 0 °C gerührt. Danach wurden 0.110 g Trifluoracetat-glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid **73** (0.184 mmol, 1.0 eq.) und 0.096 mL DIEA (0.072 g, 0.551 mmol, 3 eq.), gelöst in 5 mL *N,N'*-Dimethylformamid zugegeben und die Reaktionslösung für weitere 24 h bei RT gerührt. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels DC überprüft. Die Reaktionslösung wurde mit 30 mL Dichlormethan verdünnt. Die organische Phase wurde mit je 30 mL gesättigter NaHCO₃-Lösung, 1 M Salzsäure und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden mit Dichlormethan gegenextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das gelbliche Rohprodukt wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet und an-

schließlich säulenchromatographisch gereinigt (*n*-Hexan : Ethylacetat = 1:1). Es wurden 0.139 g (0.160 mmol) eines feinkristallinen, farblosen Feststoffs isoliert.

Analytik:

Ausbeute: 87 %. **R_F:** 0.74 (*n*-Hexan : Ethylacetat = 1:1). **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ = 0.62 (s, 3H, H-18), 0.91 (s, 3H, H-19), 0.92 (d, ³J_{HH} = 6.02 Hz, 3H, H-22), 0.93-0.99 (m, 1H, H-6), 1.01-1.23 (m, 8H, H-7, H-8, H-11, H-13, H-14, H-15, H-16, H-17), 1.25-1.43 (m, 8H, H-1, H-4, H-8, H-9, H-10, H-14, H-23), 1.34 (s, 9H, H-60), 1.45-1.49 (m, 1H, H-3), 1.51-1.55 (m, 1H, H-15), 1.60-1.63 (m, 1H, H-1), 1.64 (s, 9H, H-45), 1.69-1.87 (m, 5H, H-3, H-6, H-7, H-16, H-21), 1.90-1.93 (m, 1H, H-13), 2.17-2.28 (m, 1H, H-24), 2.19 (t, ³J_{HH} = 2.09 Hz, 0.7H, H-31), 2.29 (t, ³J_{HH} = 2.09 Hz, 0.3H, H-31), 2.31-2.45 (m, 1H, H-24), 2.97 (s, 1H, H-32), 3.06 (s, 2H, H-32), 3.17 (d, ³J_{HH} = 4.39 Hz, 2H, H-35), 3.86 (dd, ³J_{HH} = 5.90 Hz, ²J_{HH} = 13.04 Hz, H-46), 3.92 (dd, ³J_{HH} = 5.90 Hz, ²J_{HH} = 13.04 Hz, H-46), 4.03 (s, 0.6H, H-28), 4.20 (s, 1.4H, H-28), 4.44-4.52 (m, 1H, H-39), 4.69-4.74 (m, 1H, H-2), 5.18 (bs, 1H, H-40), 6.59 (t, ³J_{HH} = 4.39 Hz, 1H, H-36), 7.22 (t, ³J_{HH} = 7.11 Hz, 1H, H-52), 7.29 (t, ³J_{HH} = 7.11 Hz, 1H, H-53), 7.45 (s, 1H, H-47), 7.57 (d, ³J_{HH} = 7.64 Hz, 1H, H-51), 8.10 (d, ³J_{HH} = 7.91 Hz, 1H, H-54). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, CDCl₃): δ = 12.1 (C19), 18.6 (C22), 20.9 (C14), 23.4 (C18), 24.3 (C15), 26.4 (C8), 26.6 (C7), 27.1 (C16), 28.3 (C45), 30.2/30.4/30.7/31.1/31.2 (C1, C23, C24), 28.4 (C60), 32.2 (C23), 33.4 (C31), 34.5 (C28), 34.6 (C5), 35.0 (C6), 35.6 (C21), 35.9 (C9), 36.3 (C3), 39.5 (C28), 40.2 (C13), 40.5 (C10), 41.7 (C46), 42.0 (C4), 42.1 (C35), 42.8 (C12), 54.5 (C39), 56.2 (C17), 56.5 (C11), 71.7 (C36), 72.8 (C29), 76.0 (C2), 80.3 (C44), 83.6 (C59), 115.3 (C54), 115.6 (C57), 119.1 (C51), 122.7 (C52), 124.4 (C48), 124.6 (C53), 130.4 (C50), 135.6 (C55), 149.7 (C56), 155.5 (C41), 168.9 (C33), 171.5 (C37), 173.4 (C25), 173.6 (C25). **IR** (ATR): $\tilde{\nu}$ = 2937 (w), 2865 (w), 2362 (s), 2342 (m), 1730 (w), 1671 (s), 1626 (s), 1451 (w), 1366 (w), 1245 (w), 1198 (s), 1173 (s), 1125 (s), 1021 (m), 977 (w), 915 (w), 836 (w), 799 (m), 721 (s), 675 (m). **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für C₅₁H₇₄N₄O₈Na: m/z 893.5399, gef.: m/z 893.5488.

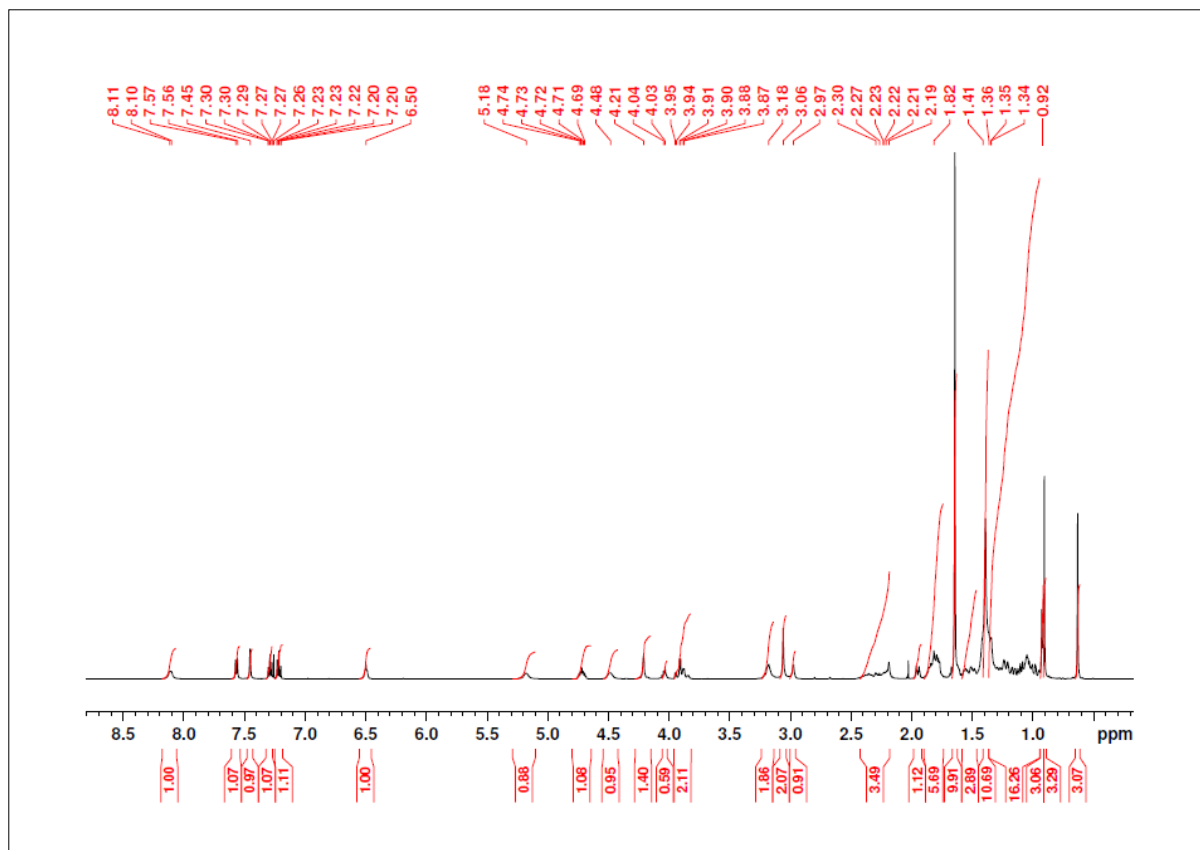


Abbildung 349: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): N-Boc-tryptophan(Boc)-N-glycin-lithocholsäure-N-methylpropargylamid 192.

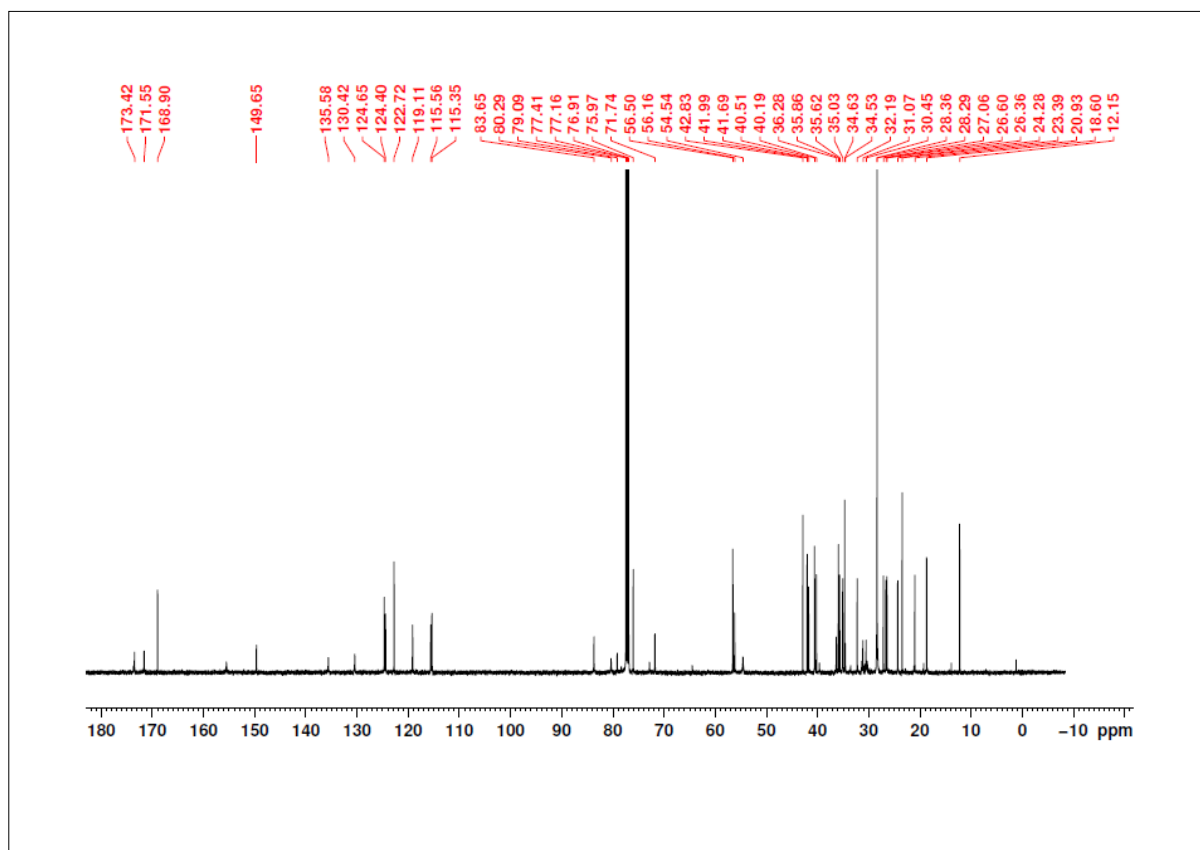
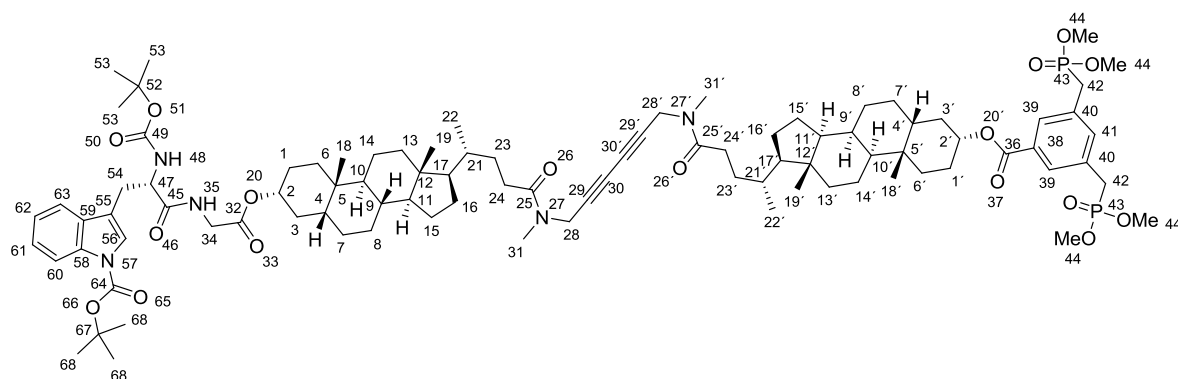


Abbildung 350: ¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃): N-Boc-tryptophan(Boc)-N-glycin-lithocholsäure-N-methylpropargylamid 192.

5.3.2.5 *N*-Boc-tryptophan(Boc)-*N*-glycin-(lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-BP 81



Ansatz:

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
<i>N</i> -Boc-Trp(Boc)-OH	404.46	1.5	0.055	0.022	
65 (5.3.1.10)	1372.61	1.0	0.037	0.051	
HCTU	413.69	1.2	0.044	0.018	
Cl-HOBt	169.57	2.5	0.092	0.016	
DIEA	129.25	6.0	0.221	0.029	0.039
CH ₂ Cl ₂					10.0
DMF					10.0

Durchführung:

0.022 g *N*-Boc-tryptophan-(Boc)-OH (0.055 mmol, 1.5 eq.), 0.018 g HCTU (0.044 mmol, 1.2 eq.) und 0.016 g Cl-HOBt (0.092 mmol, 2.5 eq.) wurden in einem Gemisch aus 10 mL Dichlormethan und 5 mL *N,N*-Dimethylformamid gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu dieser Lösung wurden 0.039 mL DIEA (0.029 g, 0.221 mmol, 6 eq.) zugegeben und die Lösung für weitere 10 min bei 0 °C gerührt. Daraufhin wurden 0.051 g Trifluoracetat-glycin-(lithocholsäure-*N*-methylpropargylamiddimer)-BP **65** (0.037 mmol, 1 eq.), gelöst in 5 mL DMF, hinzugefügt. Die gelbe Reaktionslösung wurde auf Raumtemperatur erwärmt und für weitere 18 h gerührt. Der Fortschritt der Reaktion wurde mittels DC überprüft. Das Gemisch wurde auf 20 mL Dichlormethan gegeben und anschließend mit je 50 mL gesättigter NaHCO₃-Lsg, 1 M Salzsäure und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden mit Dichlormethan gegenextrahiert, die organischen Phasen vereinigt und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt. Das gelbe, hochviskose Rohprodukt (0.2 g) wurde im Hochvakuum getrocknet und anschließend säulenchromatographisch gereinigt (Dichlormethan : Methanol =

30:1). Es konnten 0.058 g (0.035 mmol) eines farblosen feinkristallinen Produkts isoliert werden.

Analytik:

Ausbeute: 95 %. **R_F:** 0.24 (Dichlormethan : Methanol = 30:1). **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ = 0.63-0.65 (m, 6H, H-19, H-19'), 0.91-0.95 (m, 12H, H-18, H-18', H-22, H-22'), 0.98-2.02 (m, 52H), 1.30 (s, 9H, H-68), 1.64 (s, 9H, H-53), 2.17-2.29 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.30-2.38 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.95 (s, 2H, H-31, H-31'), 3.05 (s, 4H, H-31, H-31'), 3.17 (m, 2H, H-34), 3.19 (d, $^2J_{PH}$ = 21.9 Hz, 4H, H-42), 3.68 (d, $^2J_{PH}$ = 10.8 Hz, 12H, H-44), 3.83-3.95 (m, 2H, H-54), 4.10 (m, 1.2H, H-28, H-28'), 4.28 (m, 2.8H, H-28, H-28'), 4.48 (m, 1H, H-47), 4.69-4.74 (m, 1H, H-2), 4.92-4.96 (m, 1H, H-2'), 5.16 (m, 1H, H-48), 6.47 (t, $^3J_{HH}$ = 4.39 Hz, 1H, H-35), 7.21 (dd, $^3J_{HH}$ = 7.71 Hz, $^3J_{HH}$ = 7.82 Hz, 1H, H-62), 7.24 (dd, $^3J_{HH}$ = 7.71 Hz, $^3J_{HH}$ = 7.82 Hz, 1H, H-61), 7.44 (s, 1H, H-56), 7.45 (s, 1H, H-41), 7.57 (d, $^3J_{HH}$ = 7.74 Hz, 1H, H-63), 7.84 (d, $^3J_{HH}$ = 1.90 Hz, 2H, H-39), 8.11 (d, $^3J_{HH}$ = 7.41 Hz, 1H, H-60). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, CDCl₃): δ = 12.2 (C19, C19'), 18.6 (C22, C22'), 20.9/21.0 (C14, C14'), 23.4/23.5 (C18, C18'), 24.3 (C15, C15'), 26.4 (C8, C8'), 26.6/26.8 (C7, C7'), 27.0/27.1 (C16, C16'), 28.3 (C68), 28.4 (C53), 30.3/30.4/30.6/31.1/31.4 (C1, C1', C24, C24', C23, C23'), 32.1 (C42), 32.2/32.4 (C23, C23'), 33.2 (d, $^1J_{PC}$ = 115.3 Hz, C42), 33.6/33.7 (C31, C31'), 34.7 (C5, C5'), 35.0/35.2 (C6, C6'), 35.6 (C21, C21'), 35.9 (C9, C9'), 36.9 (C3, C3'), 38.7 (C28, C28'), 40.2 (C13, C13'), 40.3 (C28, C28'), 40.5/40.6 (C10, C10'), 41.7 (C54), 42.0 (C4, C4'), 42.1 (C34), 42.8/42.9 (C12, C12'), 53.1 (d, $^2J_{PC}$ = 6.8 Hz, C44), 53.5 (C47), 56.2/56.3 (C17, C17'), 56.5 (C11, C11'), 67.9 (C30, C30'), 73.8 (C29, C29'), 75.5 (C2'), 76.0 (C2), 83.7 (C67), 85.2 (C52), 115.4 (C60), 115.6 (C55), 119.1 (C63), 122.7 (C62), 124.4 (C56), 124.7 (C61), 129.7 (C39), 130.4 (C59), 131.9 (C38), 132.2 (C40), 135.3 (C41), 135.6 (C58), 149.7 (C64), 155.5 (C49), 165.6 (C36), 168.9 (C32), 171.5 (C45), 173.4 (C25, C25'). **³¹P-NMR** (202.3 MHz, CDCl₃): δ = 28.02. **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für C₉₂H₁₃₅N₅O₁₇P₂Na: m/z 1667.9253, gef.: m/z 1667.9344.

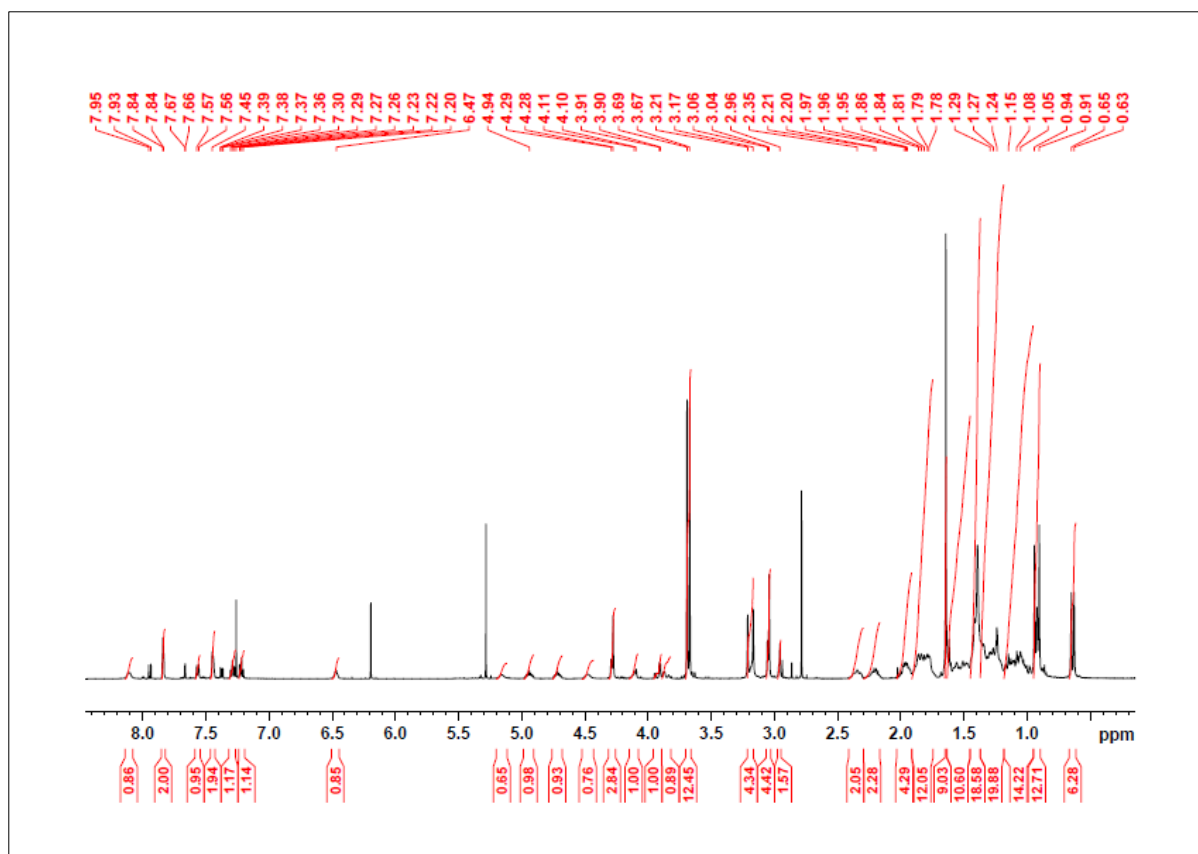


Abbildung 351: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): N-Boc-tryptophan(Boc)-N-glycin-(lithocholsäure-N-methylpropargylamid-Dimer)-BP 81.

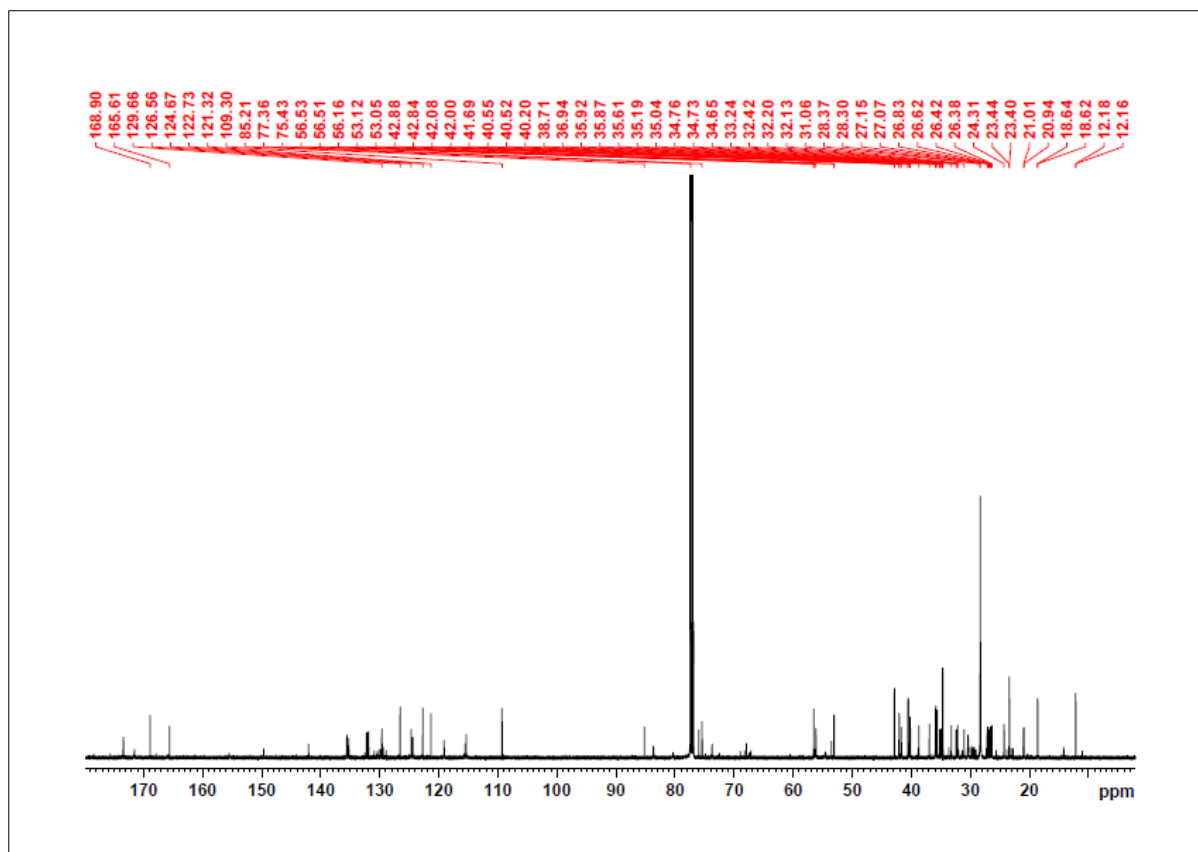
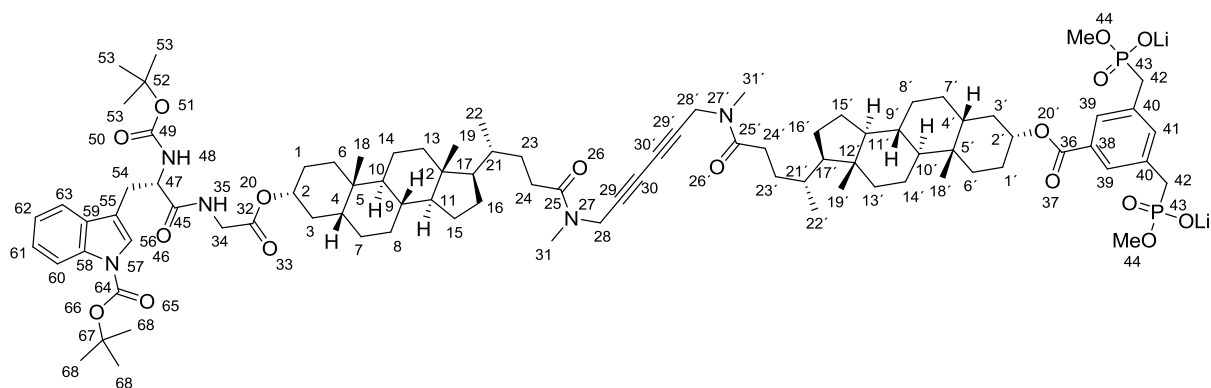


Abbildung 352: ¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃): N-Boc-tryptophan(Boc)-N-glycin-(lithocholsäure-N-methylpropargylamid-Dimer)-BP 81.

5.3.2.6 *N*-Boc-tryptophan(Boc)-*N*-glycin-(lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-BP(OLi)₂ 83



Ansatz:

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
81 (5.3.2.5)	1645.03	1.0	0.025	0.041	
LiBr	86.84	2.0	0.05	0.0043	
Acetonitril					50.0
Diethylether					10.0

Durchführung:

0.041 g *N*-Boc-tryptophan-(Boc)-*N*-glycin-(lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-BP **81** (0.025 mmol, 1 eq.) wurden in 10 mL Acetonitril gelöst und mit 0.0043 g wasserfreiem LiBr (0.05 mmol, 2.0 eq.) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 48 h bei 50 °C erhitzt. Dabei fiel das Produkt als farbloser Feststoff aus. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels DC überprüft. Nach vollständiger Umsetzung des Edukts wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur gekühlt und der Feststoff samt Reaktionslösung in ein Zentrifugenglas überführt. Der erhaltene Feststoff wurde abgetrennt und vier Mal mit je 10 mL Acetonitril, einmal mit Diethylether gewaschen. Das farblose Produkt (0.04 g, 0.024 mmol) wurde gründlich am Hochvakuum getrocknet.

Analytik:

Ausbeute: 99 %. **Schmp.:** >300 °C. **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄ = 1:1): δ = 0.51-0.53 (m, 6H, H-19, H-19'), 0.79-0.83 (m, 12H, H-18, H-18', H-22, H-22'), 0.87-1.89 (m, 52H), 1.24 (s, 9H, H-68), 1.52 (s, 9H, H-53), 2.06-2.18 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.21-2.33 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.83 (s, 2H, H-31, H-31'), 2.86 (d, ²*J*_{PH} = 21.9 Hz, 4H, H-42), 2.95 (m, 4H, H-31, H-31'), 3.42 (d, ²*J*_{PH} = 10.8 Hz, 12H, H-44), 3.77 (s, 2H, H-34), 4.02 (m, 1.2H, H-28, H-28'), 4.14 (m, 2.8H, H-28, H-28'), 4.03-4.15 (m, 2H, H-54), 4.32 (m, 1H, H-47), 4.57-4.65 (m, 1H, H-2), 4.73-4.81 (m, 1H, H-2'), 7.10 (t, ³*J*_{HH} = 7.37 Hz, 1H, H-62), 7.17 (t, ³*J*_{HH} = 7.38 Hz, 1H, H-61), 7.34 (s, 1H, H-56), 7.57 (d, ³*J*_{HH} = 7.82 Hz, 1H, H-63), 7.49 (s, 1H, H-41), 7.84 (s, 2H, H-39), 7.96 (d, ³*J*_{HH} = 7.41 Hz, 1H, H-60). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄ = 1:1): δ = 12.4 (C19, C19'), 18.9 (C22, C22'), 21.3/21.4 (C14, C14'), 23.8/23.9 (C18, C18'), 24.7 (C15, C15'), 26.7 (C8, C8'), 27.0/27.2 (C7, C7'), 27.4/27.5 (C16, C16'), 28.7 (C68), 28.7 (C53), 30.7/30.8/31.0/ 31.5/31.9 (C1, C1', C24, C24', C23, C23'), 32.5 (C42), 32.6/32.8 (C23, C23'), 33.6 (d, ¹*J*_{PC} = 115.3 Hz, C42), 33.9/34.0 (C31, C31'), 35.1 (C5, C5'), 35.4/35.6 (C6, C6'), 36.0 (C21, C21'), 36.3 (C9, C9'), 37.3 (C3, C3'), 39.1 (C28, C28'), 40.6 (C13, C13'), 40.7 (C28, C28'), 40.8/40.8 (C10, C10'), 42.1 (C54), 42.4 (C4, C4'), 42.5 (C34), 43.2/43.3 (C12, C12'), 53.5 (d, ²*J*_{PC} = 6.8 Hz, C44), 53.9 (C47), 56.6/56.7 (C17, C17'), 56.9 (C11, C11'), 68.3 (C30, C30'), 74.2 (C29, C29'), 75.9 (C2'), 76.4 (C2), 84.1 (C67), 85.6 (C52), 115.8 (C60), 115.9 (C55), 119.5 (C63), 123.1 (C62), 124.7 (C56), 125.1 (C61), 130.1 (C39), 130.8 (C59), 132.3 (C38), 132.6 (C40), 135.7 (C41), 135.9 (C58), 150.1 (C64), 155.9 (C49), 165.69 (C36), 169.3 (C32), 171.9 (C45), 173.8 (C25, C25'). **³¹P-NMR** (202.3 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄ = 1:1): δ = 22.02. **HRMS** (ESI neg., MeOH): ber. für C₉₀H₁₂₉N₅O₁₇P₂²⁻: *m/z* 807.4451, gef.: *m/z* 807.4448.

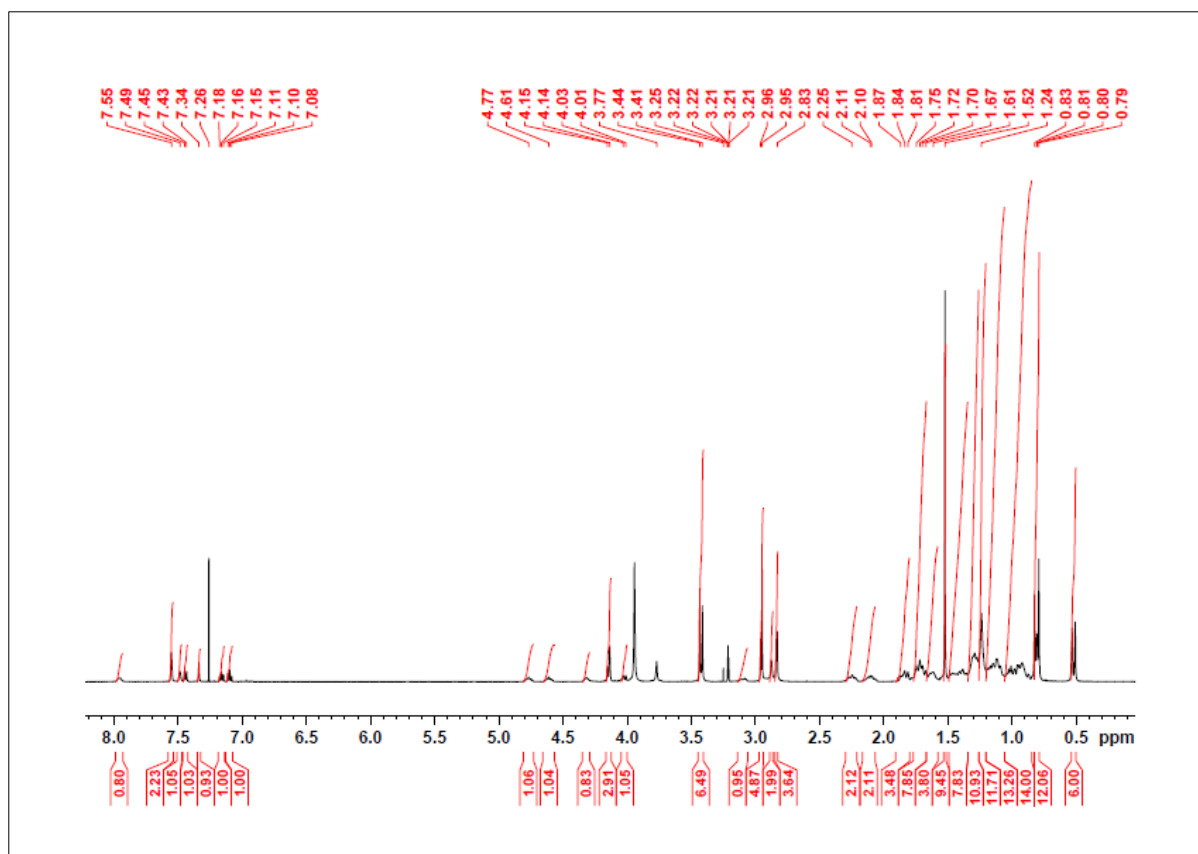


Abbildung 353: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄ = 1:1): N-Boc-tryptophan(Boc)-N-glycin-(lithocholsäure-N-methylpropargylamid-Dimer)-BP(OLi)₂ 83.

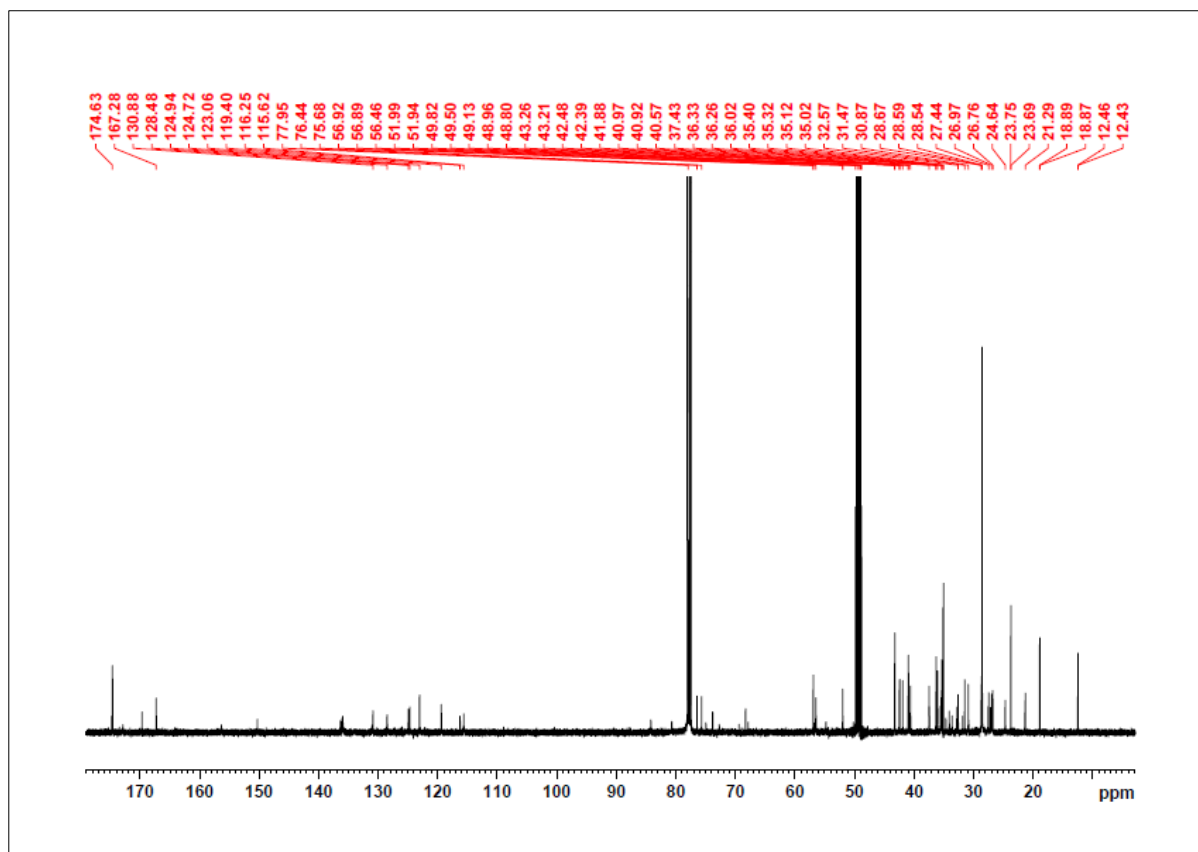
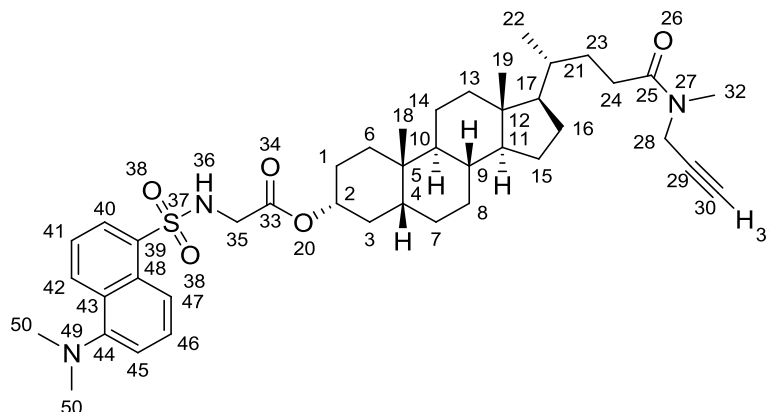


Abbildung 354: ¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄ = 1:1): N-Boc-tryptophan(Boc)-N-glycin-(lithocholsäure-N-methylpropargylamid-Dimer)-BP(OLi)₂ 83.

5.3.3 Synthese des Rezeptors 67 mit Dansyl-Akzeptor-Einheit

5.3.3.1 *N*-Dansyl-glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid 100



Ansatz:

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
Dansyl-Cl	269.75	5.0	0.919	0.248	
73 (5.3.1.3)	598.34	1.0	0.184	0.110	
DIEA	129.25	30.0	5.515	0.713	0.961
CH ₂ Cl ₂					10.0

Durchführung:

0.11 g Trifluoracetat-glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid **73** (0.184 mmol, 1 eq.) wurden in 10 mL Dichlormethan gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu dieser Lösung wurden 0.248 g Dansylchlorid (0.919 mmol, 5 eq.) und 0.961 mL DIEA (0.713 g, 5.515 mmol, 30 eq.) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde auf Raumtemperatur erwärmt und weitere 15 h unter Lichtausschluss gerührt. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels DC überprüft. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Gemisch auf 30 mL 1 N Salzsäure gegeben und mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wurde ein weiteres Mal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und die wässrigen Phasen mit Dichlormethan gegenextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel anschließend unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene gelbe, feinkristalline Rohprodukt wurde im Hochvakuum getrocknet und anschließend säulenchromatographisch gereinigt (*n*-Hexan : Ethylacetat = 2:1). Es konnten 0.106 g (0.147 mmol) des gelben Feststoffs isoliert werden.

Analytik:

Ausbeute: 80 %. **R_F:** 0.51 (*n*-Hexan : Ethylacetat = 1:1), 0.25 (*n*-Hexan : Ethylacetat = 2:1). **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ = 0.63 (s, 3H, H-19), 0.87 (s, 3H, H-18), 0.92 (d, ³J_{HH} = 6.27 Hz, 3H, H-22), 0.96-1.09 (m, 1H, H-6), 1.10-1.22 (m, 8H, H-7, H-8, H-11, H-13, H-14, H-15, H-16, H-17), 1.25-1.49 (m, 8H, H-1, H-4, H-8, H-9, H-10, H-14, H-23), 1.50-1.58 (m, 1H, H-3), 1.59-1.68 (m, 1H, H-15), 1.69-1.72 (m, 1H, H-1), 1.73-1.90 (m, 5H, H-3, H-6, H-7, H-16, H-21), 1.91-1.99 (m, 1H, H-13), 2.19 (t, ⁴J_{HH} = 2.56 Hz, 0.7H, H-31) 2.18-2.27 (m, 1H, H-24), 2.29 (t, ⁴J_{HH} = 2.56 Hz, 0.3H, H-31), 2.29-2.47 (m, 1H, H-24), 2.89 (s, 6H, H-50), 2.98 (s, 1H, H-32), 3.06 (s, 2H, H-32), 3.69 (d, ³J_{HH} = 5.31 Hz, 2H, H-35), 4.04 (d, ²J_{HH} = 2.36 Hz, 0.7H, H-28), 4.22 (d, ²J_{HH} = 2.36 Hz, 1.3H, H-28), 4.53-4.62 (m, 1H, H-2), 5.34 (t, ³J_{HH} = 5.31 Hz, 1H, H-36), 7.20 (d, ³J_{HH} = 7.82 Hz, 1H, H-45), 7.51 (t, ³J_{HH} = 7.21 Hz, 1H, H-46), 7.58 (t, ³J_{HH} = 7.94 Hz, 1H, H-41), 8.23 (d, ³J_{HH} = 7.21 Hz, 1H, H-42), 8.32 (d, ³J_{HH} = 8.64 Hz, 1H, H-47), 8.57 (d, ³J_{HH} = 8.30 Hz, 1H, H-40). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, CDCl₃): δ = 12.1 (C19), 18.8 (C22), 20.9 (C14), 23.3 (C18), 24.3 (C15), 26.4 (C8), 26.7 (C7), 27.0 (C16), 28.3 (C1), 30.5 (C23), 31.1 (C24), 31.4 (C24), 32.0 (C23), 33.5 (C32), 34.5 (C5), 34.6 (C32), 34.9 (C6), 35.6 (C21), 35.8 (C9), 36.3 (C3), 39.6 (C28), 40.1 (C13), 40.2 (C28), 40.5 (C10), 41.9 (C35), 42.8 (C4), 44.7 (C12), 45.6 (C50), 56.3 (C17), 56.5 (C11), 71.2 (C29), 72.8 (C29), 76.4 (C2), 78.4 (C30), 79.1 (C30), 115.6 (C45), 119.2 (C40), 123.3 (C46), 128.6 (C41), 129.8 (C42), 129.9 (C43), 129.9 (C48), 130.8 (C47), 134.3 (C39), 152.8 (C44), 168.2 (C33), 173.4 (C25), 173.6 (C25). **IR** (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3272 (w), 2929 (s), 2863 (m), 2788 (w), 1732 (m), 1643 (s), 1574 (m), 1449 (s), 1398 (m), 1201 (s), 1143 (s), 1118 (s), 1063 (m), 1003 (m), 980 (m), 945 (m), 911 (m), 848 (m), 788 (s), 728 (s), 680 (m). **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für C₄₂H₅₉N₃O₅SNa: m/z 740.4068, gef.: m/z 740.4090.

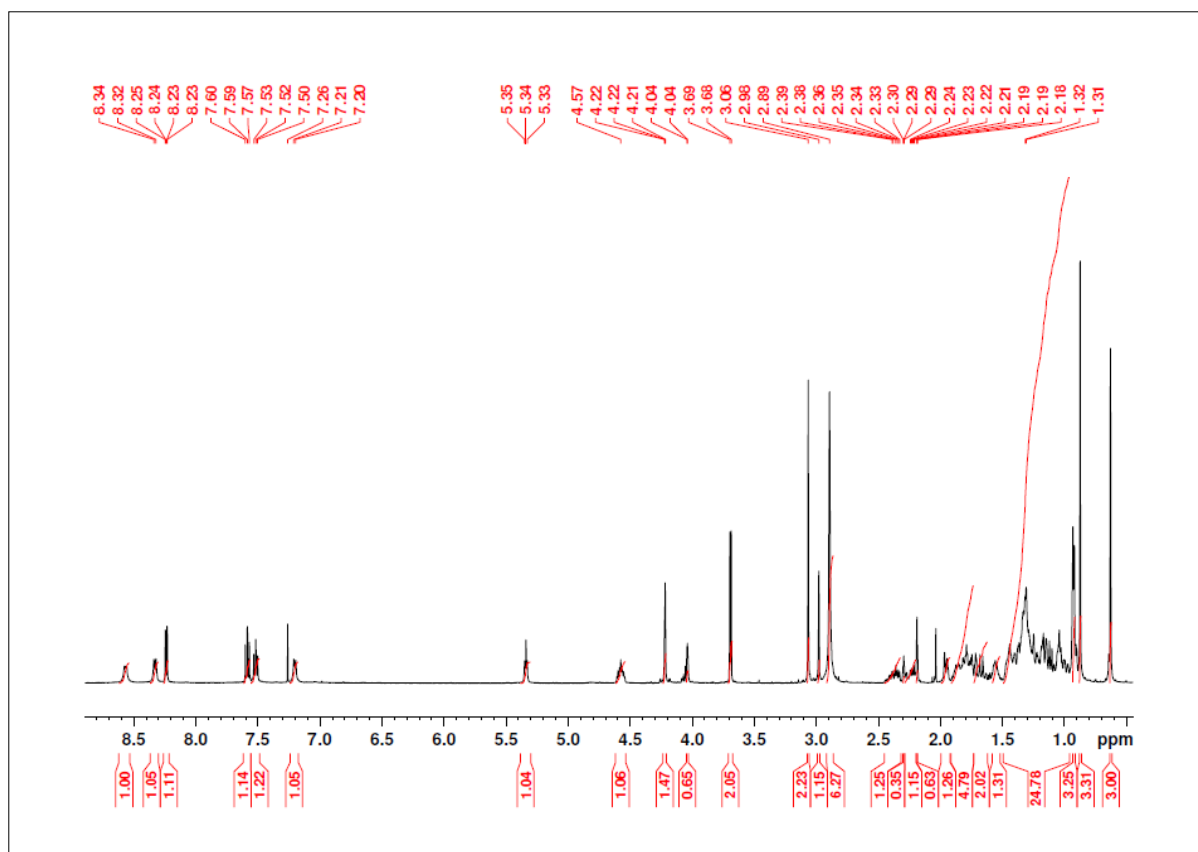


Abbildung 355: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): N-Dansyl-glycin-lithocholsäure-N-methylpropargylamid 100.

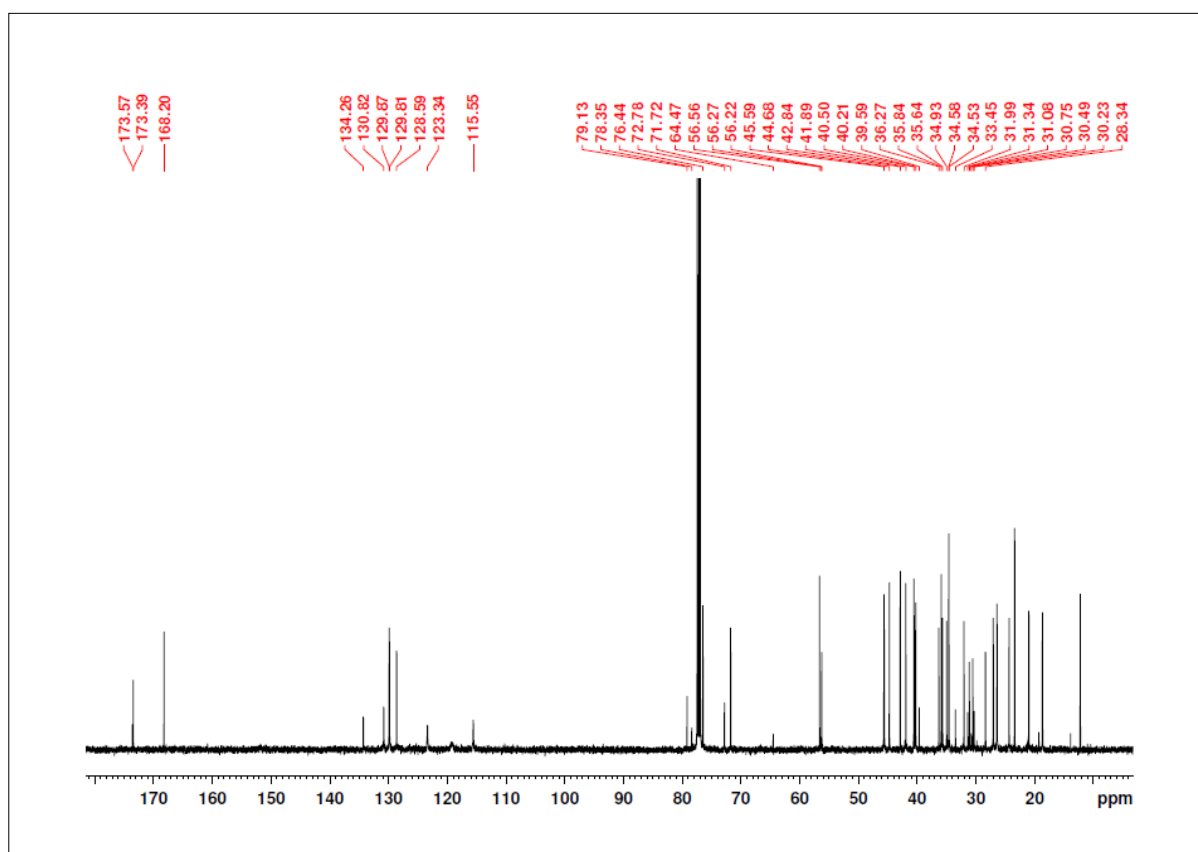
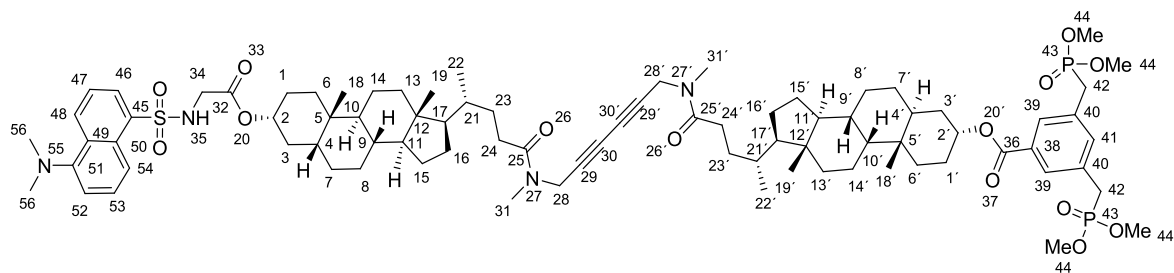


Abbildung 356: ¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃): N-Dansyl-glycin-lithocholsäure-N-methylpropargylamid 100.

5.3.3.2 *N*-Dansyl-glycin-(lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-BP 84



Ansatz:

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
Dansyl-Cl	269.75	5.0	0.182	0.05	
65 (5.3.1.10)	1372.61	1.0	0.037	0.05	
DIEA	129.25	30.0	1.093	0.141	0.190
CH ₂ Cl ₂					10.0

Durchführung:

0.05 g Trifluoracetat-glycin-(lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-BP **65** (0.037 mmol, 1 eq.) wurden in 10 mL Dichlormethan gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu dieser Lösung wurden 0.05 g Dansylchlorid (0.182 mmol, 5 eq.) und 0.19 mL DIEA (0.141 g, 1.093 mmol, 30 eq.) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde auf Raumtemperatur erwärmt und weitere 15 h unter Lichtausschluss gerührt. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels DC überprüft. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Gemisch auf 30 mL 1 M Salzsäure gegeben und mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wurde ein weiteres Mal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und die wässrigen Phasen mit Dichlormethan gegenextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel anschließend unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene gelbe, hochviskose Rohprodukt wurde im Hochvakuum getrocknet und anschließend säulenchromatographisch gereinigt (Dichlormethan : Methanol = 30:1). Es konnten 0.041 g (0.027 mmol) eines gelben Öls isoliert werden.

Analytik:

Ausbeute: 74 %. **R_F:** 0.36 (Dichlormethan : Methanol = 30:1). **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ = 0.62-0.65 (m, 6H, H-19, H-19'), 0.86-0.94 (m, 12H, H-18, H-18', H-22, H-22'), 1.00-2.02 (m, 52H), 2.15-2.28 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.30-2.41 (m, 2H, H-28, H-28'), 2.87 (s, 6H, H-56), 2.96 (s, 2H, H-31, H-31'), 3.04 (s, 4H, H-31, H-31'), 3.19 (d, $^2J_{PH}$ = 21.9 Hz, 4H, H-42), 3.68 (d, $^3J_{PH}$ = 10.8 Hz, 12H, H-44), 4.06 (d, $^3J_{HH}$ = 5.43 Hz, 2H, H-34), 4.09 (m, 1.2H, H-28, H-28'), 4.28 (m, 2.8H, H-28, H-28'), 4.53-4.59 (m, 1H, H-2), 4.91-4.97 (m, 1H, H-2'), 5.40 (t, $^3J_{HH}$ = 5.43 Hz, 1H, H-35), 7.17 (d, $^3J_{HH}$ = 7.49 Hz, 1H, H-52), 7.44 (s, 1H, H-41), 7.50 (dd, $^3J_{HH}$ = 7.38 Hz, $^3J_{HH}$ = 8.45 Hz, 1H, H-53), 7.57 (dd, $^3J_{HH}$ = 7.71 Hz, $^3J_{HH}$ = 8.53 Hz, 1H, H-47), 7.83 (s, 2H, H-39), 8.22 (dd, $^3J_{HH}$ = 7.29 Hz, $^4J_{HH}$ = 1.16 Hz, 1H, H-48), 8.31 (d, $^3J_{HH}$ = 8.66 Hz, 1H, H-54), 8.53 (d, $^3J_{HH}$ = 8.51 Hz, 1H, H-46). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, CDCl₃): δ = 12.2 (C19, C19'), 18.6 (C22, C22'), 20.9/21.0 (C14, C14'), 23.3/23.4 (C18, C18'), 24.3 (C15, C15'), 26.4 (C8, C8'), 26.6/26.8 (C7, C7'), 27.1/27.2 (C16, C16'), 28.3/30.3/30.4/31.1/31.4/32.0 (C1, C1', C23, C23', C24, C24'), 32.1 (d, $^1J_{PC}$ = 115.3 Hz, C42), 32.2/32.4 (C23, C23'), 33.6 (C31, C31'), 34.6/34.7 (C5, C5'), 34.7 (C31, C31'), 34.9/35.2 (C6, C6'), 35.6/35.8 (C21, C21'), 35.9 (C9, C9'), 37.0 (C3, C3'), 40.2 (C28, C28'), 40.3 (C13, C13'), 40.3 (C28, C28'), 40.5/40.6 (C10, C10'), 41.7 (C34), 41.9/42.1 (C4, C4'), 42.8/42.9 (C12, C12'), 45.5 (C56), 53.1 (d, $^2J_{PC}$ = 6.8 Hz, C44), 56.1/56.2 (C17, C17'), 56.3/56.5 (C11, C11'), 67.9 (C30, C30'), 73.8 (C29, C29'), 75.4 (C2), 76.4 (C2'), 115.4 (C52), 119.0 (C46), 123.2 (C53), 128.6 (C47), 129.4 (C39), 129.7 (C48), 129.8 (C49), 130.0 (C50), 130.9 (C54), 131.9 (C38), 132.2 (C40), 134.2 (C45), 135.3 (C41), 152.1 (C51), 165.6 (C36), 168.2 (C32), 173.4 (C25, C25'). **³¹P-NMR** (121.5 MHz, CDCl₃): δ = 28.05. **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für C₈₃H₁₂₀N₄O₁₄P₂SNa: m/z 1513.7889, gef.: m/z 1513.7919.

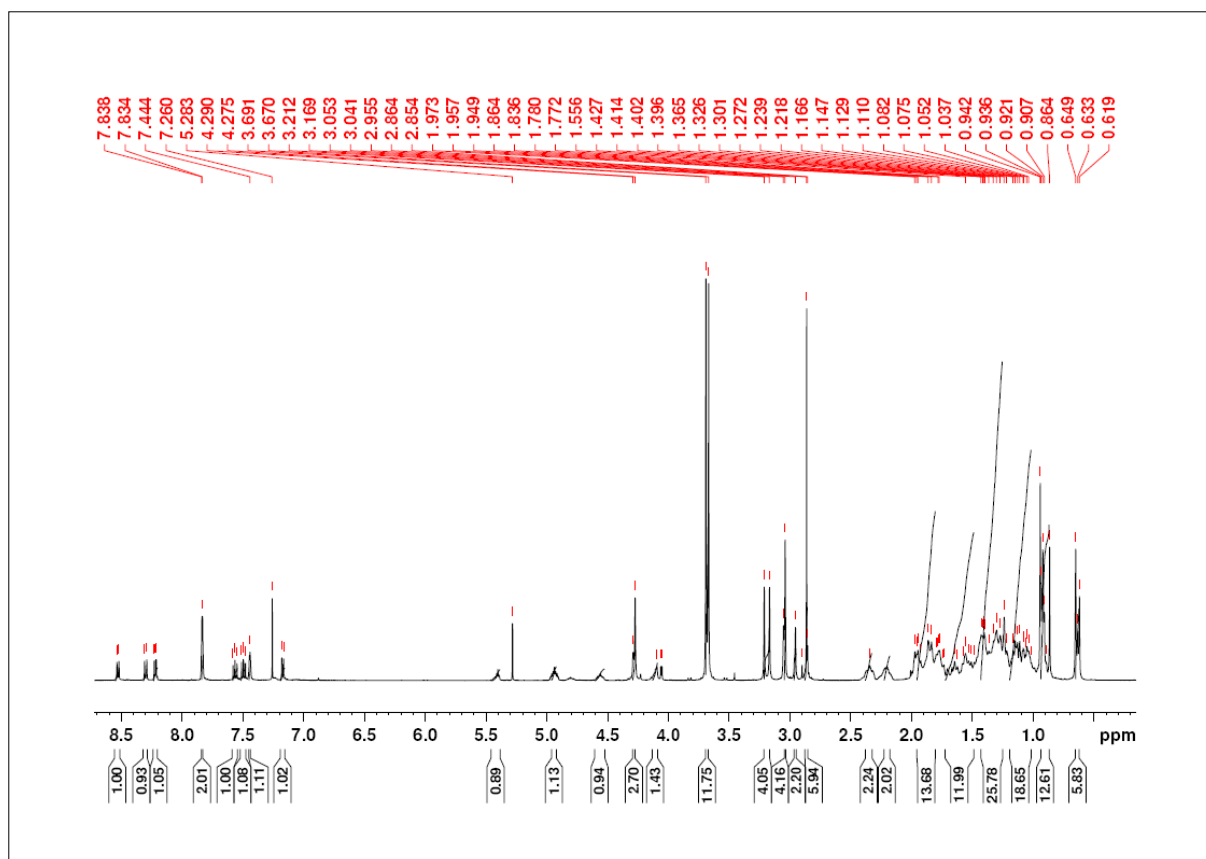


Abbildung 357: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): N-Dansyl-glycin-(lithocholsäure-N-methylpropargylamid-Dimer)-BP 84.

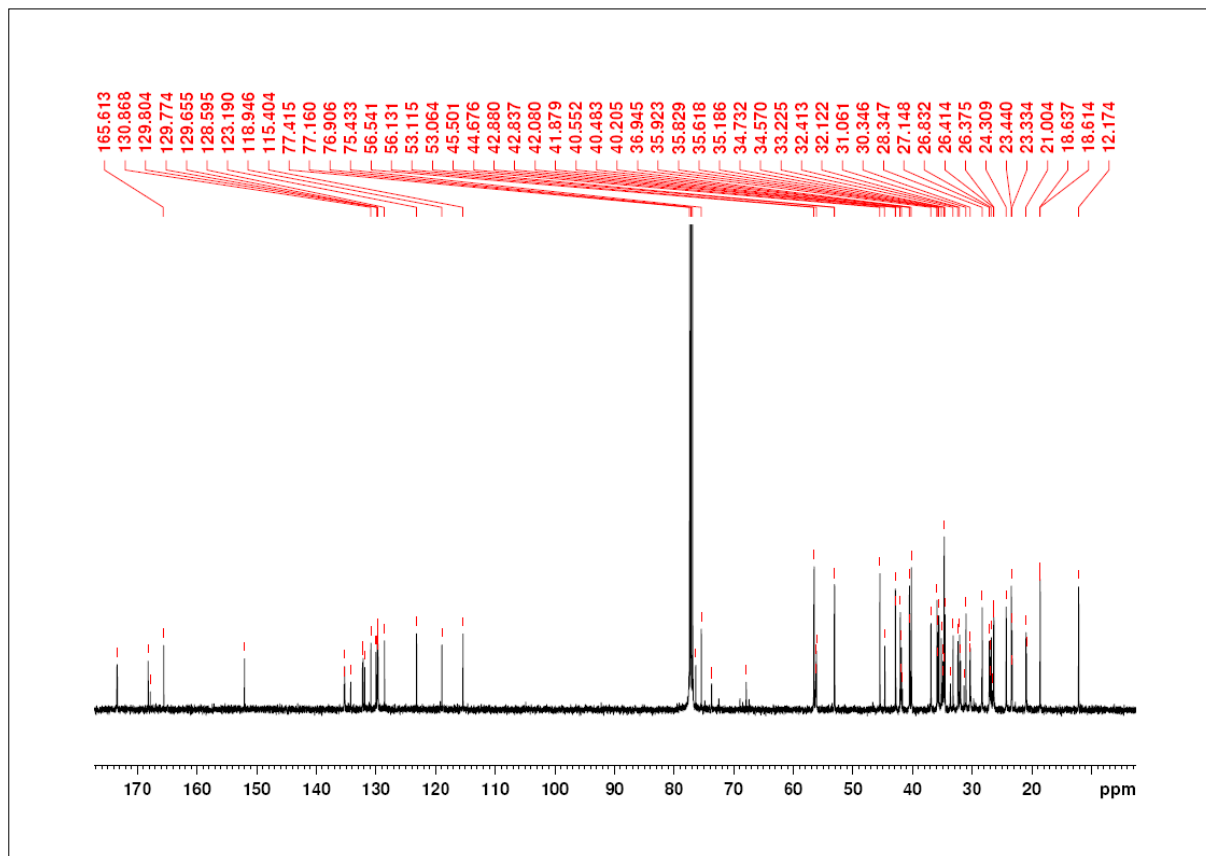
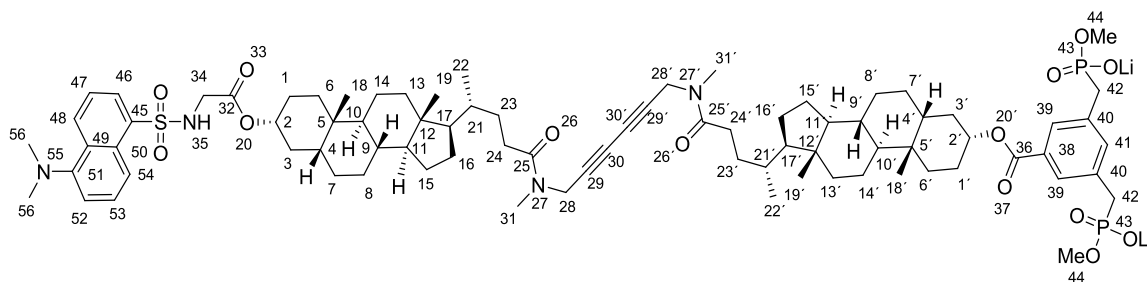


Abbildung 358: ¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃): N-Dansyl-glycin-(lithocholsäure-N-methylpropargylamid-Dimer)-BP 84.

5.3.3.3 *N*-Dansyl-glycin-(lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-BP(OLi)₂ **67****Ansatz:**

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
84 (5.3.3.2)	1491.87	1.0	0.028	0.042	
LiBr	86.84	2.5	0.071	0.006	
CH ₃ CN					10.0

Durchführung:

0.042 g *N*-Dansyl-glycin-(lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-BP **84** (0.028 mmol, 1 eq.) wurden in 10 mL Acetonitril gelöst und mit 0.006 g wasserfreiem LiBr (0.071 mmol, 2.5 eq.) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 72 h auf 50 °C erhitzt. Dabei fiel das Produkt als gelber Feststoff aus. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels DC überprüft. Nach vollständiger Umsetzung des Edukts wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur gekühlt und der Feststoff samt Reaktionslösung in ein Zentrifugenglas überführt. Der erhaltene Feststoff wurde abgetrennt und vier Mal mit je 10 mL Acetonitril, einmal mit Diethylether gewaschen. Das gelbe Produkt (0.04 g, 0.027 mmol) wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Analytik:

Ausbeute: 98 %. **Schmp.:** >300 °C **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄ = 1:1): δ = 0.50-0.52 (m, 6H, H-19, H-19'), 0.74-0.81 (m, 12H, H-18, H-18', H-22, H-22'), 0.87-1.90 (m, 52H), 2.05-2.17 (m, 2H, H-28, H-28'), 2.21-2.30 (m, 2H, H-28, H-28'), 2.73 (s, 6H, H-56), 2.82 (m, 2H, H-31, H-31'), 2.85 (d, ²*J*_{PH} = 21.9 Hz, 4H, H-42), 2.94 (m, 4H, H-31, H-31'), 3.41 (d, ³*J*_{PH} = 10.8 Hz, 6H, H-44), 4.02 (d, ³*J*_{HH} = 5.43 Hz, 2H, H-34), 4.07 (m, 1.2H, H-28, H-28'), 4.13 (m, 2.8H, H-28, H-28'), 4.34-4.43 (m, 1H, H-2), 4.71-4.80 (m, 1H, H-2'), 7.06 (d, ³*J*_{HH} = 7.16 Hz, 1H, H-52), 7.38 (dd, ³*J*_{HH} = 7.39 Hz, ³*J*_{HH} = 8.49 Hz, 1H, H-53), 7.44 (dd, ³*J*_{HH} = 7.69 Hz, ³*J*_{HH} = 8.58 Hz, 1H, H-47), 7.47 (s, 1H, H-41), 7.54 (s, 2H, H-39), 8.07 (dd, ³*J*_{HH} = 7.30 Hz, ⁴*J*_{HH} = 1.18 Hz, 1H, H-48), 8.17 (d, ³*J*_{HH} = 8.67 Hz, 1H, H-54), 8.39 (d, ³*J*_{HH} = 8.53 Hz, 1H, H-46). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄ = 1:1): δ = 12.6/12.7 (C19, C19'), 19.1 (C22, C22'), 21.5/21.6 (C14, C14'), 23.9/24.0 (C18, C18'), 24.9 (C15, C15'), 26.9 (C8, C8'), 27.0/27.1 (C7, C7'), 27.4/27.6 (C16, C16'), 28.9/30.8/31.1/31.7/31.8/32.5 (C1, C1', C23, C23', C24, C24'), 32.1 (C42), 32.2/32.4 (C23, C23'), 33.0 (C42), 33.7 (C31, C31'), 35.2/35.3 (C5, C5'), 35.3 (C31, C31'), 35.4/35.7 (C6, C6'), 36.2/36.4 (C21, C21'), 36.5 (C9, C9'), 37.6 (C3, C3'), 40.7 (C28, C28'), 40.8 (C13, C13'), 40.9 (C28, C28'), 40.9/41.0 (C10, C10'), 42.3 (C34), 42.5/42.7 (C4, C4'), 43.4/43.5 (C12, C12'), 45.1 (d, ¹*J*_{PC} = 115.3 Hz, C42), 45.9 (C56), 53.5 (d, ²*J*_{PC} = 6.8 Hz, C44), 56.5/56.6 (C17, C17'), 56.7/56.9 (C11, C11'), 68.3 (C30, C30'), 74.2 (C29, C29'), 75.8 (C2), 76.8 (C2'), 115.8 (C52), 119.3 (C46), 123.6 (C53), 128.9 (C47), 129.4 (C39), 130.0 (C48), 130.2 (C49), 130.4 (C50), 131.3 (C54), 132.3 (C38), 132.6 (C40), 134.6 (C45), 135.6 (C41), 152.6 (C51), 165.9 (C36), 168.6 (C32), 174.4 (C25, C25'), 174.6 (C25, C25'). **³¹P-NMR** (121.5 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄ = 1:1): δ = 22.01. **IR** (ATR): $\tilde{\nu}$ = 2933 (m), 2861 (m), 1723 (m), 1645 (m), 1638 (m), 1419 (m), 1390 (w), 1381 (w), 1317 (m), 1128 (s), 1193 (s), 1180 (s), 1043 (s), 982 (m), 960 (m), 900 (m), 835 (m), 798 (s), 724 (m). **HRMS** (ESI neg., MeOH): ber. für C₈₁H₁₁₄N₄O₁₄P₂S²⁻: m/z 730.3769, gef.: m/z 730.3831.

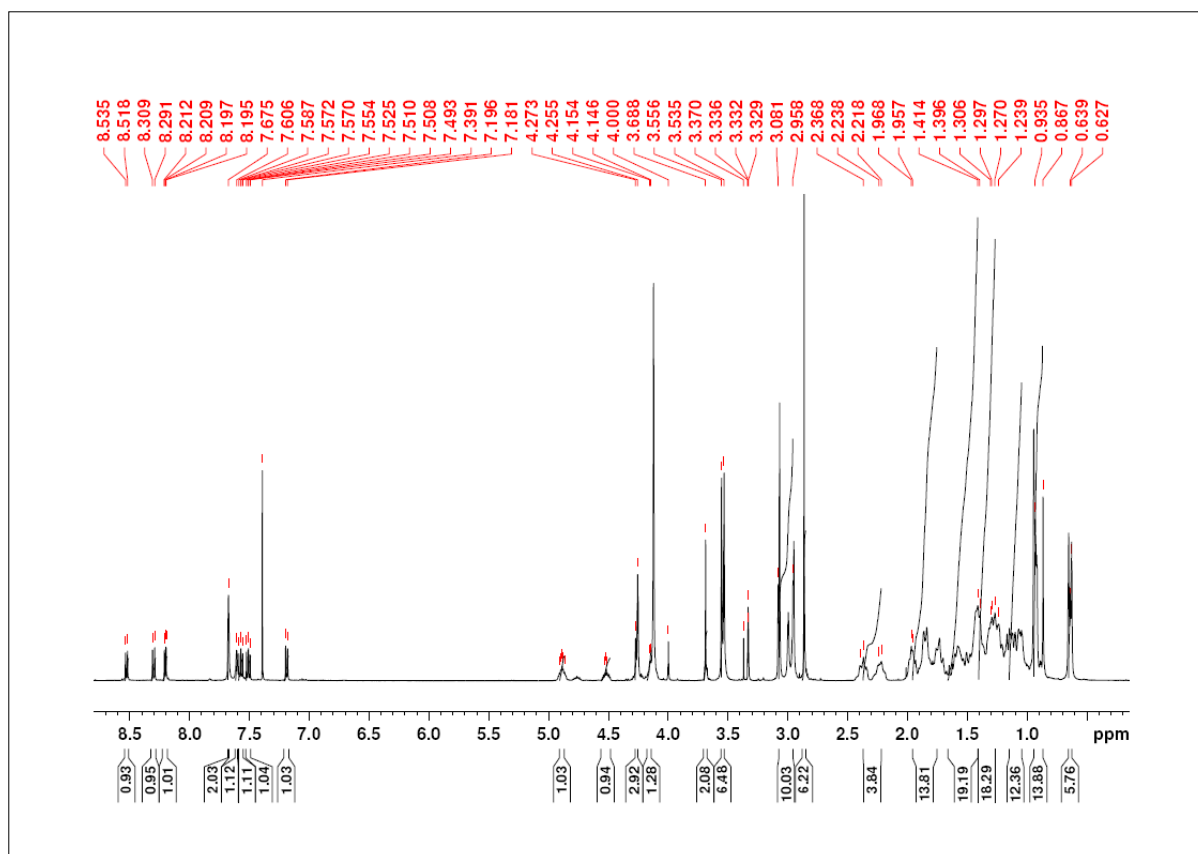


Abbildung 359: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄ = 1:1): N-Dansyl-glycin-(lithocholsäure-N-methylpropargylamid-Dimer)-BP(OLi)₂ 67.

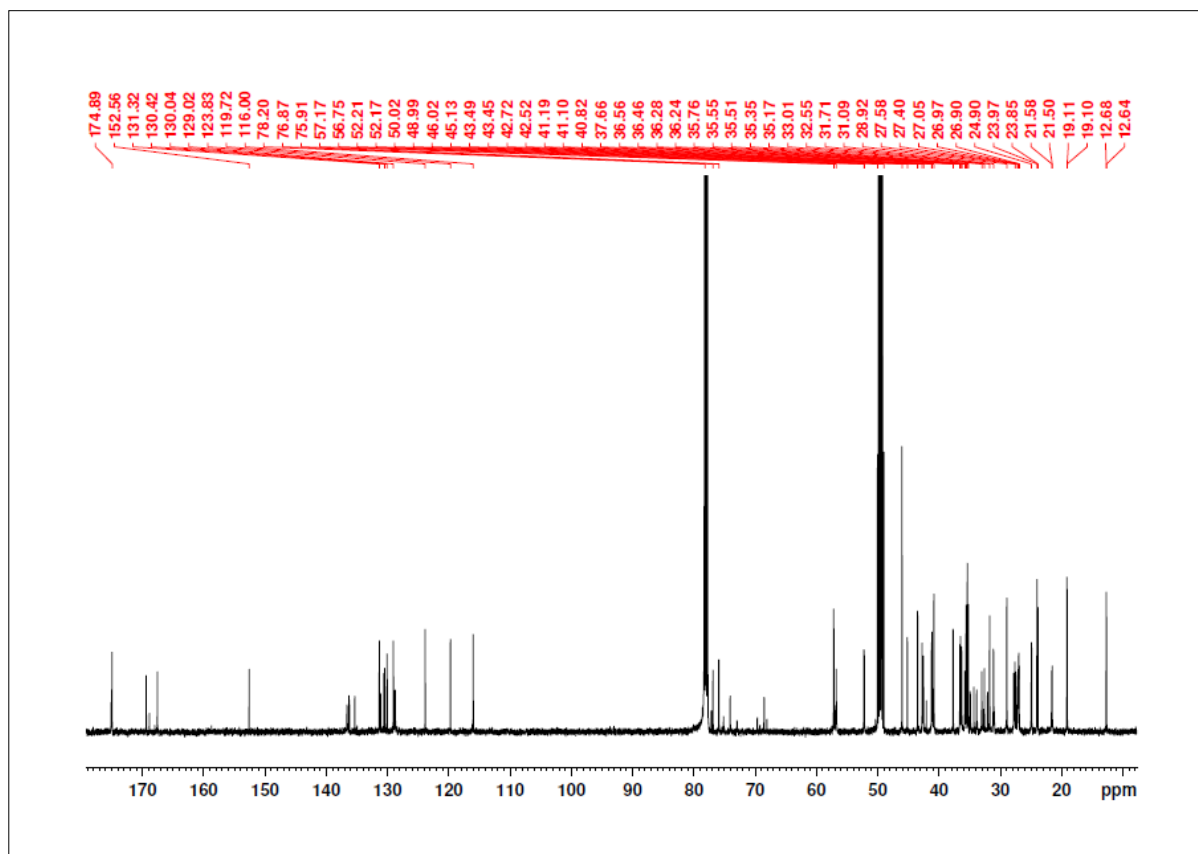
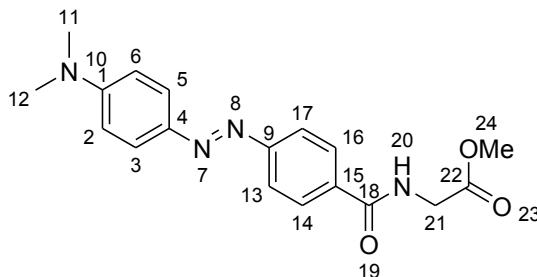


Abbildung 360: ¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄ = 1:1): N-Dansyl-glycin-(lithocholsäure-N-methylpropargylamid-Dimer)-BP(OLi)₂ 67.

5.3.4 Synthese des Rezeptors 121 mit Dabcyl-Quencher-Einheit

5.3.4.1 N-Dabcyl-glycin-OMe (193)



Ansatz:

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
Dabcyl-OSu	366.40	1.0	0.273	0.100	
Glycin-OMe hydrochlorid	598.73	1.0	0.273	0.034	
DIEA	129.25	5.0	1.365	0.178	0.24
CH ₂ Cl ₂					5.0
DMF					1.0

Durchführung:

0.1 g Dabcyl-OSu (0.273 mmol, 1 eq.) und 0.034 g Glycin-OMe hydrochlorid (0.273 mmol, 1 eq.) wurden in einem 2:1-Gemisch aus 5 mL Dichlormethan und 1 mL *N,N'*-Dimethylformamid gelöst. Anschließend wurden 0.24 mL DIEA (1.365 mmol, 5 eq.) hinzugegeben und die Reaktionslösung 4 h bei RT gerührt. Der Reaktionsverlauf wurde mittels DC überprüft. Das Reaktionsgemisch wurde mit 10 mL Dichlormethan verdünnt, zweimal mit jeweils 10 mL 1 M Essigsäure und gesättigter NaHCO₃-Lösung extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene rote Rohprodukt wurde im Hochvakuum getrocknet. Anschließend wurde säulenchromatographisch gereinigt (*n*-Hexan : Ethylacetat = 1:1). Es konnten 0.070 mg (0.206 mmol) eines roten, kristallinen Feststoffes erhalten werden.

Analytik:

Ausbeute: 75 %. **R_F:** 0.4 (*n*-Hexan : Ethylacetat = 1:1). **¹H-NMR** (300 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄ = 1:1): δ = 2.94 (s, 6H, H-11, H-12), 3.61 (3H, H-24), 4.02 (s, 2H, H-21), 6.58-6.61 (m, 2H, H-2, H-6), 7.67-7.70 (m, 4H, H-13, H-14, H-16, H-17), 7.77-7.80 (m, 2H, H-3, H-5). **¹³C-NMR** (75.4 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄ = 1:1): δ = 39.7 (C11, C12), 41.2 (C21), 51.9 (C24), 111.1 (C2, C6), 121.7 (C13, C17), 125.1 (C3, C5), 127.8 (C14, C16), 133.1 (C15), 143.0 (C4), 152.7 (C10), 154.9 (C9), 167.9 (C18), 170.4 (C22). **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für: C₁₈H₂₀N₄O₃Na: *m/z* 363.1449, ber. für: C₁₈H₂₁N₄O₃: *m/z* 341.1608, gef.: *m/z* 363.1452, *m/z* 341.1629.

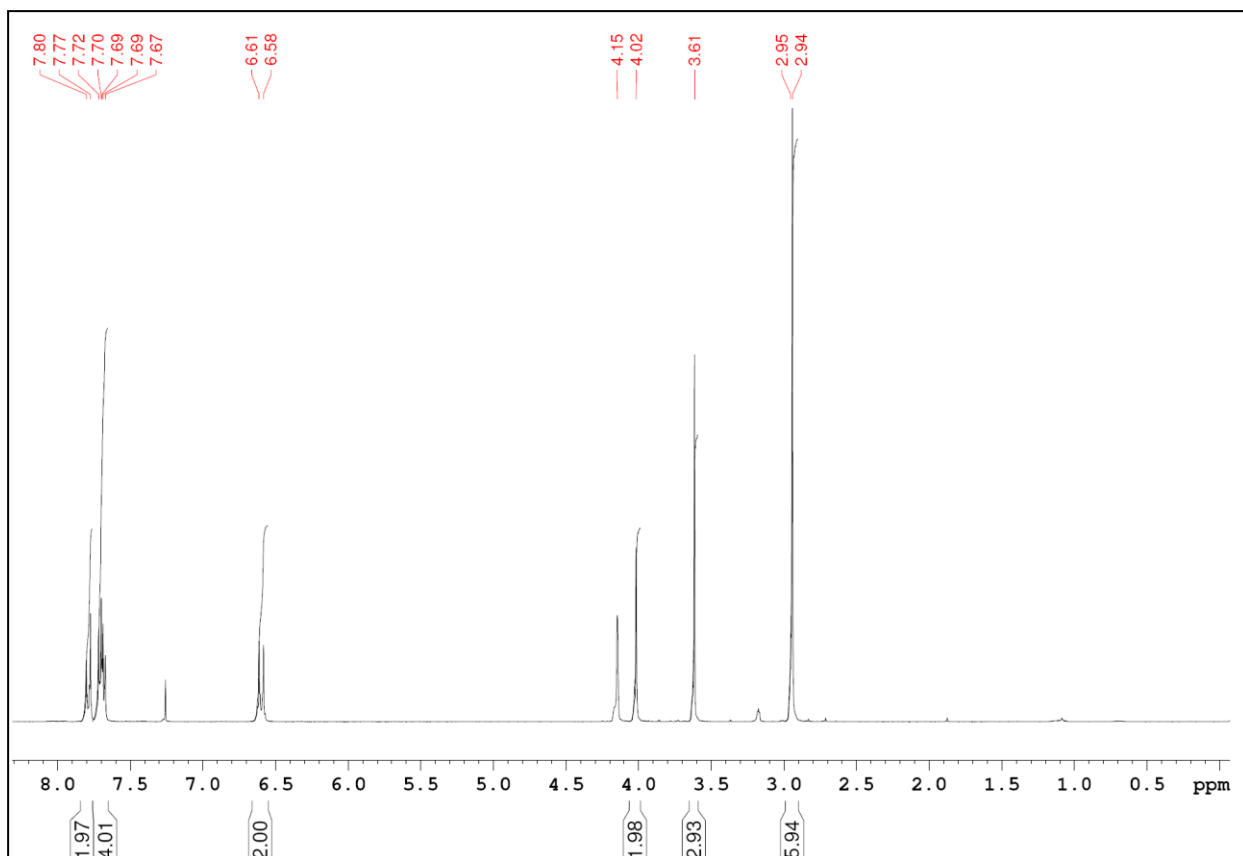


Abbildung 361: ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄ = 1:1): N-Dabcyglycin-OMe (193).

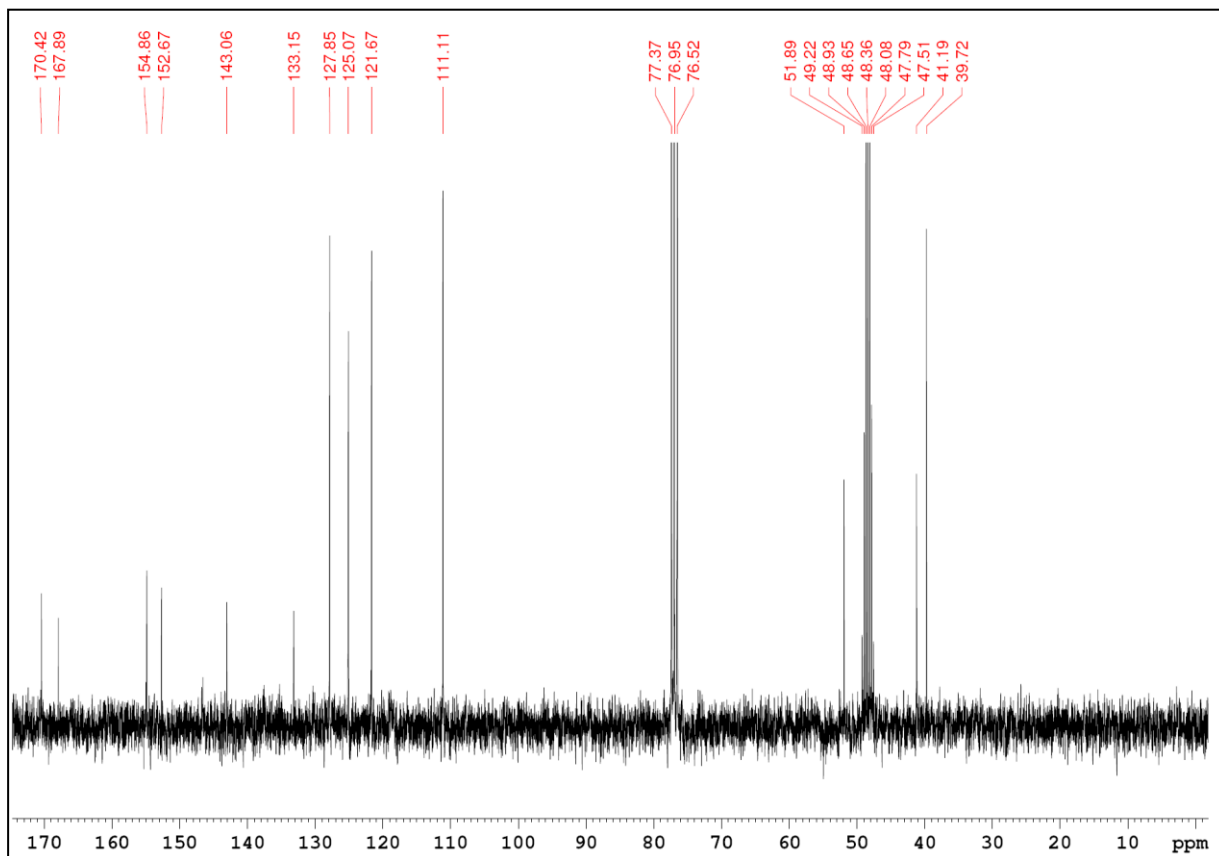
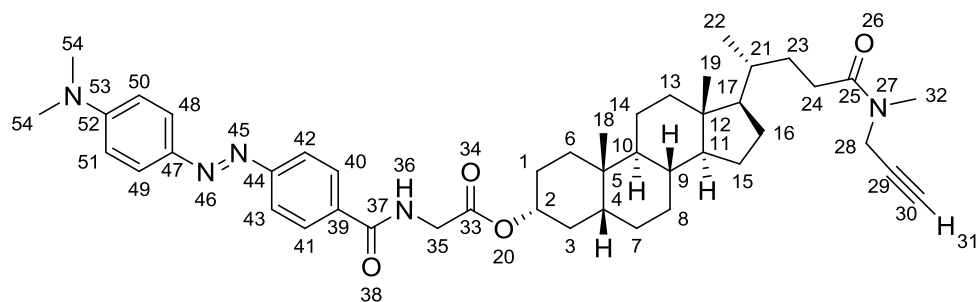


Abbildung 362: ¹³C-NMR (75.4 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄ = 1:1): N-Dabcyglycin-OMe (193).

5.3.4.2 *N*-Dabcyl-glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid 111Ansatz:

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
Dabcyl-OSu	366.40	1.2	0.20	0.076	
73 (5.3.1.3)	598.73	1.0	0.17	0.102	
DIEA	129.25	5.0	0.84	0.111	0.15
CH ₂ Cl ₂					20.0
DMF					10.0

Durchführung:

0.102 g Trifluoracetat-glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid **73** (0.17 mmol, 1 eq.) und 0.076 g Dabcyl-*O*-succinimid (0.20 mmol, 1.2 eq.) wurden in einem 2:1-Gemisch aus 20 mL Dichlormethan und 10 mL *N,N'*-Dimethylformamid gelöst. Anschließend wurden 0.15 mL DIEA (0.84 mmol, 5 eq.) hinzugegeben und die Reaktionslösung 15 h bei RT gerührt. Der Reaktionsverlauf wurde mittels DC überprüft. Das Reaktionsgemisch wurde zweimal mit jeweils 60 mL 1 M Essigsäure und gesättigter NaHCO₃-Lösung extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene rote Rohprodukt wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet. Anschließend wurde säulenchromatographisch gereinigt (Dichlormethan : Methanol = 19:1, nach Abtrennung des Edukts: *n*-Hexan : Ethylacetat = 1:1). Es konnten 0.056 g (0.08 mmol) eines roten, kristallinen Feststoffes erhalten werden.

Analytik:

Ausbeute: 47 %. **R_F:** 0.48 (*n*-Hexan : Ethylacetat = 1:1), 0.61 (Dichlormethan : Methanol = 19:1). **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄=5:1): δ = 0.65 (s, 3H, H-19), 0.93 (s, 3H, H-18), 0.94 (d, ³*J*_{HH} = 6.28 Hz, 3H, H-22), 0.99-1.12 (m, 1H, H-6), 1.13-1.25 (m, 8H, H-7, H-8, H-11, H-13, H-14, H-15, H-16, H-17), 1.28-1.52 (m, 8H, H-1, H-4, H-8, H-9, H-10, H-14, H-23), 1.53-1.61 (m, 1H, H-3), 1.62-1.71 (m, 1H, H-15), 1.72-1.75 (m, 1H, H-1), 1.76-1.93 (m, 5H, H-3, H-6, H-7, H-16, H-21), 1.94-2.03 (m, 1H, H-13), 2.19 (t, ⁴*J*_{HH} = 2.72 Hz, 0.7H, H-31) 2.18-2.27 (m, 1H, H-24), 2.30 (t, ⁴*J*_{HH} = 2.72 Hz, 0.3H, H-31), 2.29-2.48 (m, 1H, H-24), 2.98 (s, 1H, H-54), 3.00 (s, 1H, H-32), 3.07 (s, 2H, H-32), 3.19 (s, 5H, H-54), 4.04 (d, ²*J*_{HH} = 2.36 Hz, 0.7H, H-28), 4.22 (d, ²*J*_{HH} = 2.36 Hz, 1.3H, H-28), 4.24 (d, ³*J*_{HH} = 2.73 Hz, 2H, H-35), 4.53-4.84 (m, 1H, H-2), 6.76 (t, ³*J*_{HH} = 6.27 Hz, 1H, H-36), 6.92 (d, ³*J*_{HH} = 9.15 Hz, 2H, H-50, H-51), 7.91-8.19 (m, 6H, H-40, H-41, H-42, H-43, H-48, H-49). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, CDCl₃): δ = 12.2 (C19), 18.7 (C22), 20.0 (C14), 23.4 (C18), 24.4 (C15), 26.4 (C8), 26.7 (C7), 27.1 (C16), 28.4 (C1), 30.5 (C23), 31.1 (C24), 31.5 (C24), 32.3 (C23), 33.5 (C32), 34.6 (C5), 34.7 (C32), 35.1 (C6), 35.7 (C21), 35.9 (C9), 36.3 (C3), 39.6 (C28), 40.1 (C13), 40.2 (C28), 40.6 (C10), 41.4 (C35), 42.1 (C4), 42.4 (C12), 42.9 (C54), 43.6 (C54), 56.2 (C17), 56.6 (C11), 71.8 (C29), 72.8 (C29), 76.4 (C2), 77.7 (C30), 79.2 (C30), 121.9 (C50, C51), 123.0 (C42, C43), 124.5 (C48, C49), 124.8 (C47), 128.3 (C40, C41), 128.4 (C44), 131.3 (C39), 134.1 (C52), 166.6 (C37), 169.8 (C33), 173.5 (C25), 173.6 (C25). **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für C₄₅H₆₂N₅O₄: *m/z* 736.4830, gef.: *m/z* 736.4796; ber. für C₄₅H₆₁N₅O₄Na: *m/z* 758.4616, gef.: *m/z* 758.4638.

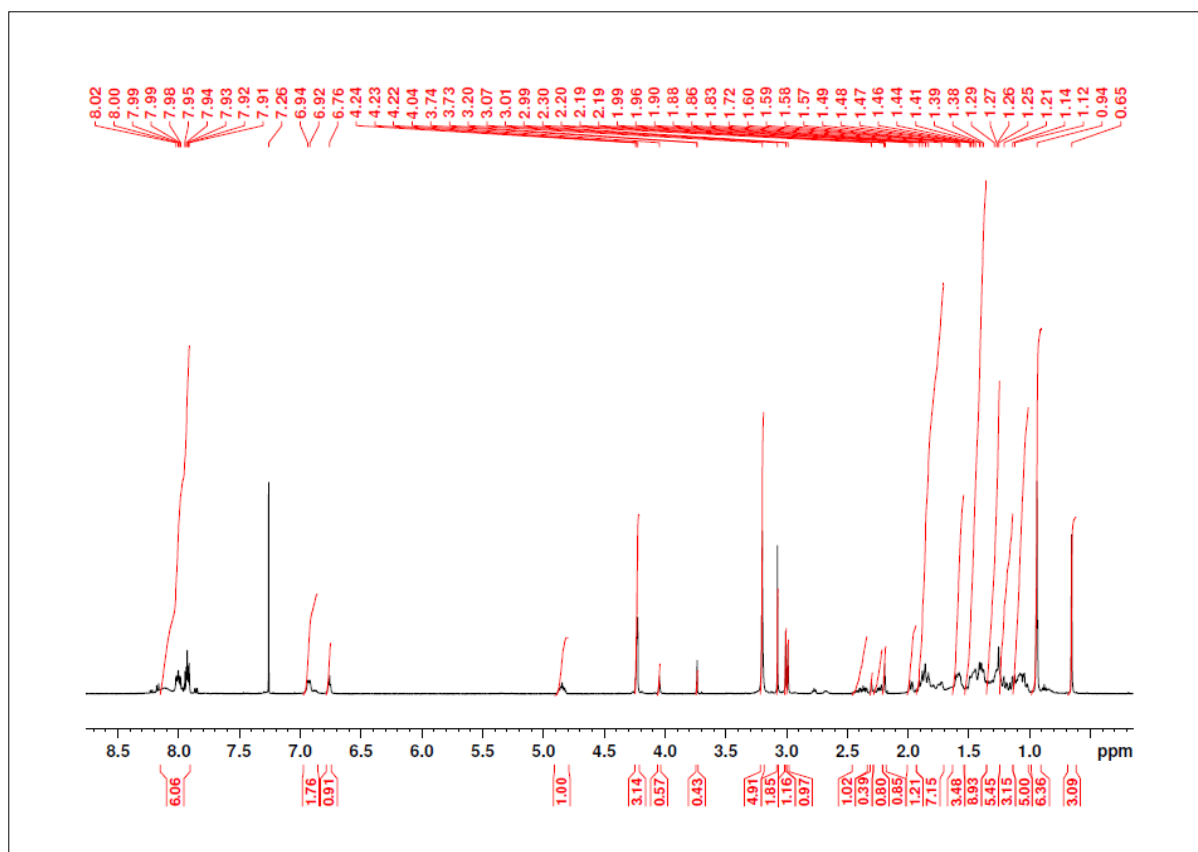


Abbildung 363: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄=5:1): N-DabcyL-glycin-lithocholsäure-N-methylpropargylamid 111.

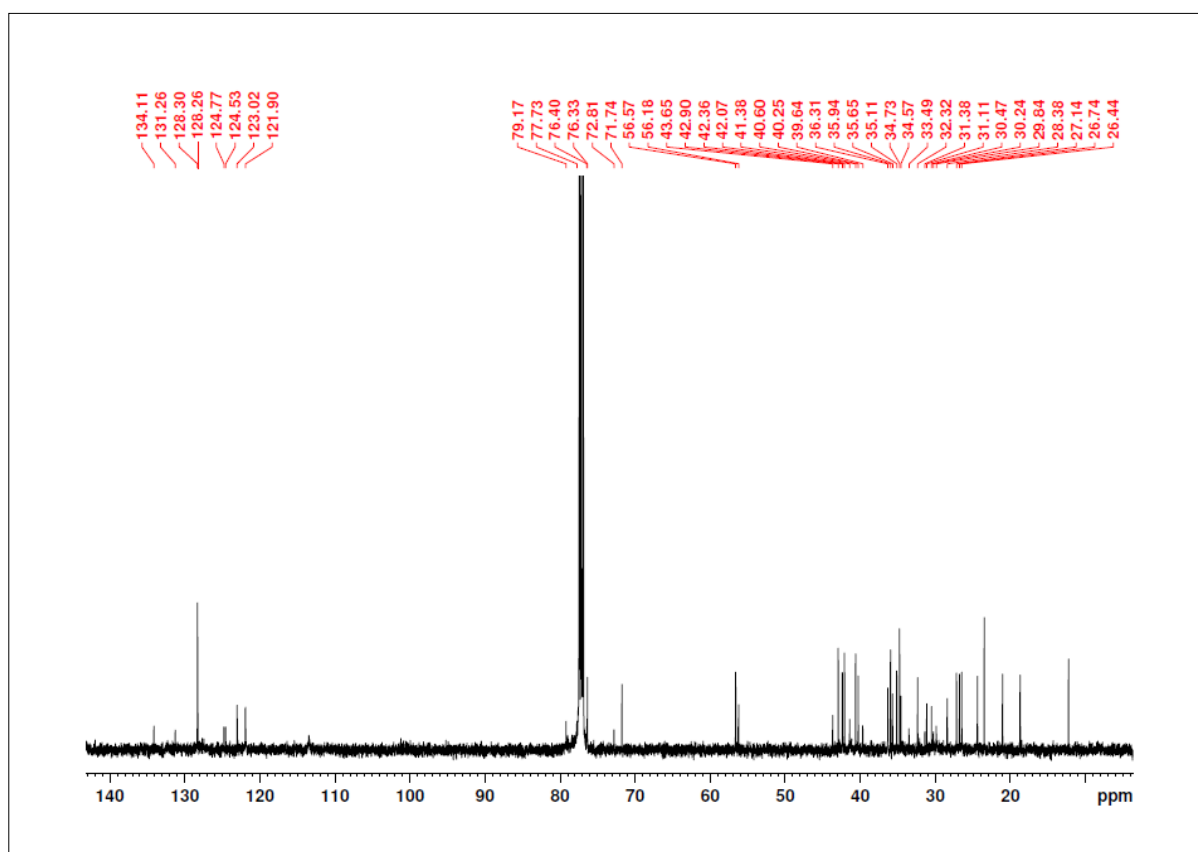
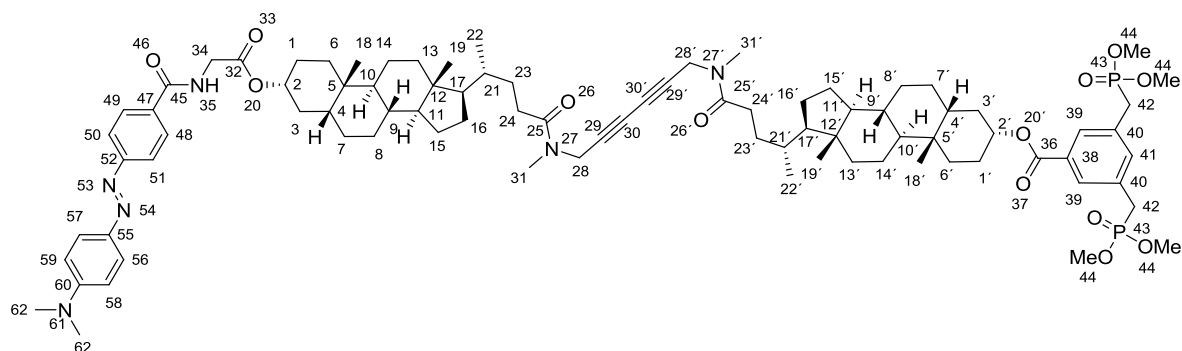


Abbildung 364: ¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃): N-DabcyL-glycin-lithocholsäure-N-methylpropargylamid 111.

5.3.4.3 *N*-Dabcyl-glycin-(lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-BP 122



Ansatz:

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
Dabcyl-OSu	366.4	1.2	0.02	0.007	
65 (5.3.1.10)	1372.61	1.0	0.016	0.023	
DIEA	129.25	5.0	0.082	0.011	0.02
CH ₂ Cl ₂					10.0
DMF					5.0

Durchführung:

0.023 g Trifluoracetat-glycin-(lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-BP **65** (0.016 mmol, 1 eq.) und 0.007 g Dabcyl-*O*-succinimid (0.02 mmol, 1.2 eq.) wurden in einem 2:1-Gemisch aus 10 mL Dichlormethan und 5 mL *N,N'*-Dimethylformamid gelöst. Anschließend wurden 0.02 mL DIEA (0.082 mmol, 5 eq.) hinzugegeben und die Reaktionslösung 24 h bei RT gerührt. Der Reaktionsverlauf wurde mittels DC überprüft. Das Reaktionsgemisch wurde jeweils mit 30 mL 1 M Essigsäure, gesättigter NaHCO₃-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene rote Rohprodukt wurde im Hochvakuum getrocknet. Anschließend wurde säulenchromatographisch gereinigt (Dichlormethan : Aceton = 1:2). Es konnten 0.019 mg (0.013 mmol) eines roten, kristallinen Feststoffes erhalten werden.

Analytik:

Ausbeute: 55 %. **R_F:** 0.25 (Dichlormethan : Methanol = 39:1); 0.4 (Dichlormethan : Aceton = 1:2). **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ = 0.68-0.70 (m, 6H, H-19, H-19'), 0.96-0.99 (m, 6H, H-22, H-22'), 0.97 (s, 6H, H-18, H-18'), 1.00-2.07 (m, 52H), 2.24-2.33 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.33-2.42 (m, 2H, H-28, H-28), 3.00 (s, 2H, H-31, H-31'), 3.07 (s, 4H, H-31, H-31'), 3.10 (s, 1H, H-62), 3.23 (d, ²J_{PH} = 21.9 Hz, 4H, H-42), 3.28 (s, 5H, H-62), 3.72 (d, ³J_{PH} = 10.8 Hz, 12H, H-44), 4.15 (m, 1.2H, H-28, H-28'), 4.25 (d, ³J_{HH} = 5.43 Hz, 2H, H-34), 4.32 (m, 2.8H, H-28, H-28'), 4.82-4.92 (m, 1H, H-2), 4.95-5.00 (m, 1H, H-2'), 6.11 (t, ³J_{HH} = 5.43 Hz, 1H, H-35), 6.88-6.93 (m, 2H, H-58, H-59), 7.48 (s, 1H, H-41), 7.88 (s, 2H, H-39), 7.90-8.27 (m, 6H, H-48, H-49, H-50, H-51, H-56, H-57). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, CDCl₃): δ = 12.2 (C19, C19'), 18.6/18.7 (C22, C22'), 20.9/21.0 (C14, C14'), 23.4/23.5 (C18, C18'), 24.3 (C15, C15'), 26.4 (C8, C8'), 26.6/26.8 (C7, C7'), 27.1/27.2 (C16, C16'), 28.3/30.3/30.4/31.1/31.4/32.0 (C1, C1', C23, C23', C24, C24'), 32.1 (d, ¹J_{PC} = 115.3 Hz, C42), 32.2/32.4 (C23, C23'), 33.3 (C31, C31'), 34.6/34.7 (C5, C5'), 34.8 (C31, C31'), 35.1/35.2 (C6, C6'), 35.6 (C21, C21'), 36.0 (C9, C9'), 37.0 (C3, C3'), 40.2 (C28, C28'), 40.3 (C13, C13'), 40.3 (C28, C28'), 40.5/40.6 (C10, C10'), 42.0/42.1 (C4, C4'), 42.4 (C34), 42.8 (C12, C12'), 42.9 (C62, C62'), 44.7 (C62, C62'), 53.1 (d, ²J_{PC} = 6.8 Hz, C44), 56.1 (C17, C17'), 56.5 (C11, C11'), 67.9 (C30, C30'), 73.8 (C29, C29'), 75.4 (C2), 76.4 (C2'), 121.9 (C50, C51), 123.0 (C42, C43), 124.5 (C48, C49), 124.8 (C47), 128.3 (C40, C41), 128.4 (C44), 129.4 (C39), 131.3 (C39), 131.9 (C38), 132.2 (C40), 134.1 (C52), 135.3 (C41), 165.6 (C36), 166.7 (C45), 169.6 (C32), 173.5 (C25), 173.6 (C25). **³¹P-NMR** (121.5 MHz, CDCl₃): δ = 28.2. **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für C₈₆H₁₂₂N₆O₁₃P₂Na: m/z 1531.8448, gef.: m/z 1531.8543; ber. für C₈₆H₁₂₃N₆O₁₃P₂: m/z 1509.8629, gef.: m/z 1509.8744.

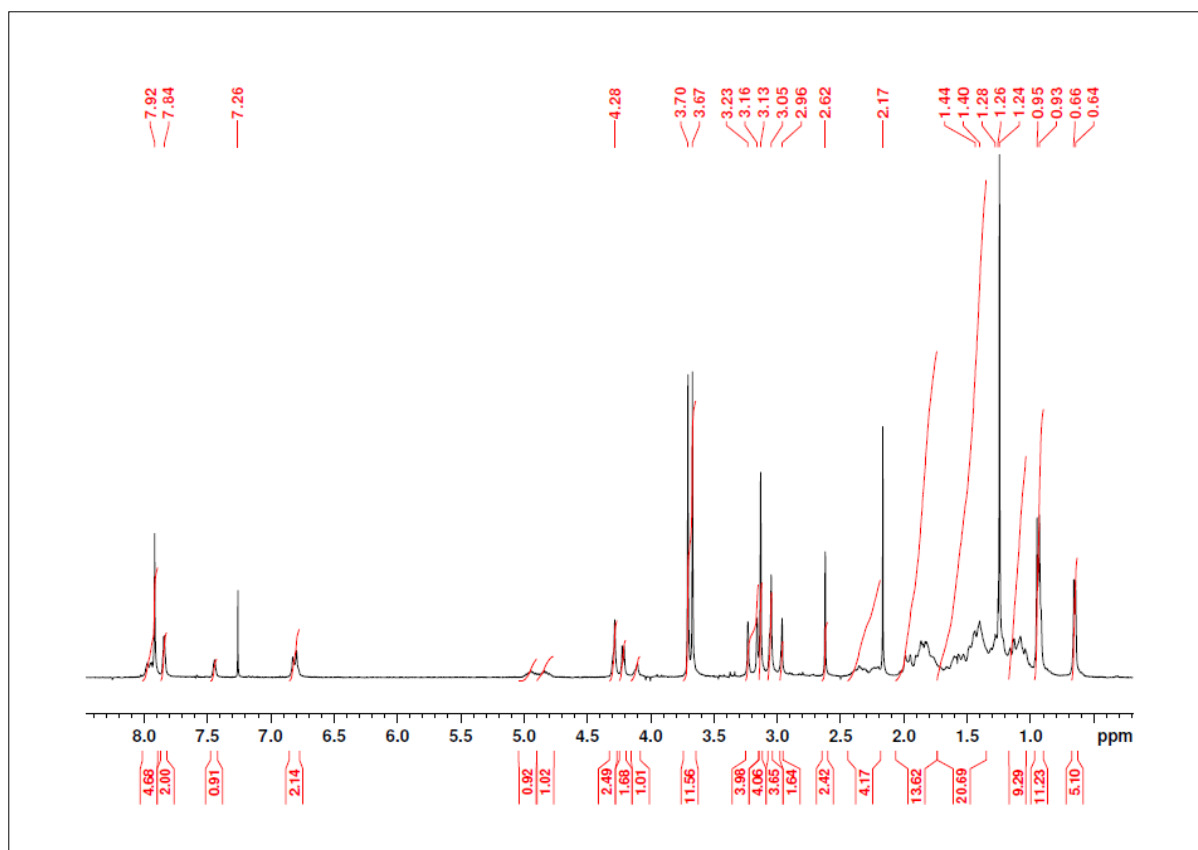


Abbildung 365: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): N-DabcyI-glycin-(lithocholsäure-N-methylpropargylamid-Dimer)-BP 122.

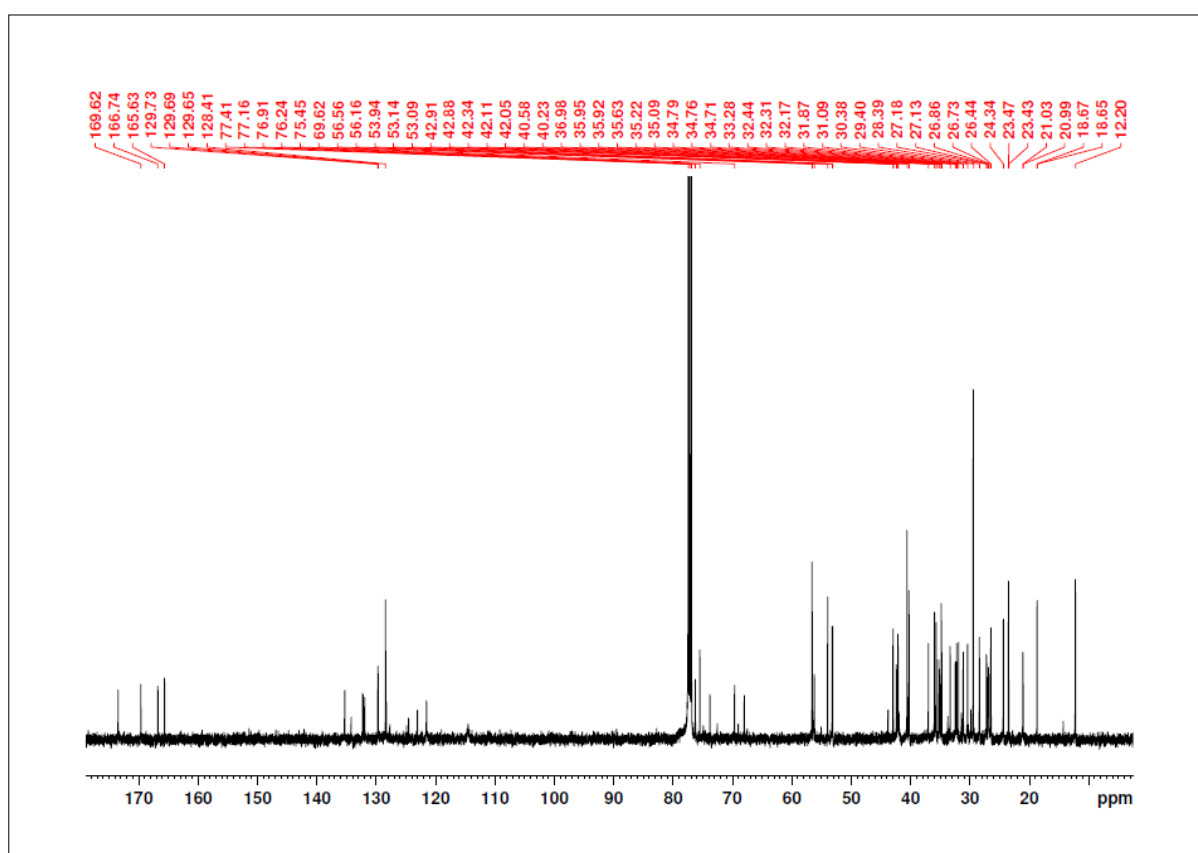
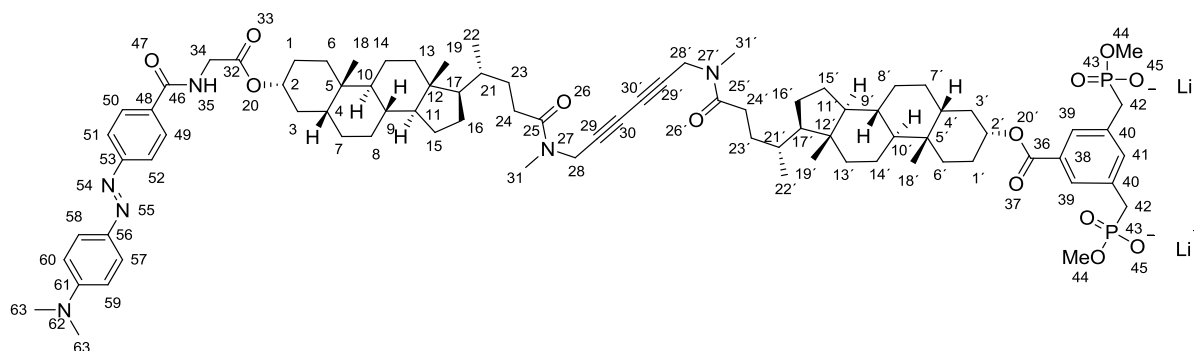


Abbildung 366: ¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃): N-DabcyI-glycin-(lithocholsäure-N-methylpropargylamid-Dimer)-BP 122.

5.3.4.4 *N*-Dabcyl-glycin-(lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-BP(OLi)₂ **121****Ansatz:**

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
122 (5.3.4.3)	1509.37	1.0	0.013	0.02	
LiBr	86.84	2.2	0.029	0.0025	
CH ₃ CN					10.0

Durchführung:

0.02 g *N*-Dabcyl-glycin-(lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-BP **122** (0.013 mmol, 1 eq.) wurden in 10 mL Acetonitril gelöst und mit 0.0025 g wasserfreiem LiBr (0.029 mmol, 2.2 eq.) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 24 h unter Rückfluss erhitzt. Dabei fiel das Produkt als roter Feststoff aus. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels DC überprüft. Nach vollständiger Umsetzung des Edukts wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur gekühlt und der Feststoff samt Reaktionslösung in ein Zentrifugenglas überführt. Der erhaltene Feststoff wurde abgetrennt und vier Mal mit je 10 mL Acetonitril, einmal mit Diethylether gewaschen. Das gelbe Produkt (0.019 g, 0.012 mmol) wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Analytik:

Ausbeute: 98 %. **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄ = 2:1): δ = 0.36-0.38 (m, 6H, H-19, H-19'), 0.64-0.67 (m, 6H, H-22, H-22'), 0.65-0.67 (m, 6H, H-18, H-18'), 0.70-1.72 (m, 52H), 1.93-2.03 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.05-2.17 (m, 2H, H-28, H-28), 2.64 (s, 1H, H-63), 2.66 (s, 2H, H-31, H-31'), 2.70 (d, ²*J*_{PH} = 21.9 Hz, 4H, H-42), 2.79 (s, 4H, H-31, H-31'), 2.81 (s, 5H, H-63), 3.24 (d, ³*J*_{PH} = 10.8 Hz, 6H, H-44), 3.82 (m, 1.8H, H-28, H-28'), 3.89 (d, ³*J*_{HH} = 5.43 Hz, 2H, H-34), 3.97 (m, 2.2H, H-28, H-28'), 4.45-4.55 (m, 1H, H-2), 4.57-4.63 (m, 1H, H-2'), 6.47-6.49 (m, 2H, H-59, H-60), 7.25 (s, 1H, H-41), 7.44 (s, 2H, H-39), 7.54-7.69 (m, 6H, H-49, H-50, H-51, H-52, H-57, H-58). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄ = 2:1): δ = 12.3/12.4 (C19, C19'), 18.8 (C22, C22'), 21.4 (C14, C14'), 23.6/23.7 (C18, C18'), 24.7 (C15, C15'), 26.7 (C8, C8'), 26.8 (C7, C7'), 27.1/27.2 (C16, C16'), 28.7/30.5/30.6/30.9/31.6/31.9 (C1, C1', C23, C23', C24, C24'), 32.7 (d, ¹*J*_{PC} = 115.3 Hz, C42), 32.4/32.6 (C23, C23'), 33.5 (C31, C31'), 34.8/34.9 (C5, C5'), 35.0 (C31, C31'), 35.3/35.4 (C6, C6'), 35.7 (C21, C21'), 36.1 (C9, C9'), 37.1 (C3, C3'), 40.3 (C28, C28'), 40.4 (C13, C13'), 40.5 (C28, C28'), 40.6/40.7 (C10, C10'), 42.1/42.2 (C4, C4'), 42.5 (C34), 42.9 (C12, C12'), 43.0 (C62, C62'), 44.8 (C63, C63'), 53.2 (d, ²*J*_{PC} = 6.8 Hz, C44), 56.2 (C17, C17'), 56.6 (C11, C11'), 68.0 (C30, C30'), 73.9 (C29, C29'), 75.5 (C2), 76.5 (C2'), 121.9 (C50, C51), 123.1 (C42, C43), 124.6 (C49, C50), 124.9 (C48), 128.3 (C40, C41), 128.5 (C44), 129.5 (C39), 131.1 (C39), 131.9 (C38), 132.3 (C40), 134.2 (C51), 135.3 (C41), 167.5 (C36), 169.0 (C45), 170.4 (C32), 175.0 (C25), 175.2 (C25). **³¹P-NMR** (121.5 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄ = 2:1): δ = 22.01. **HRMS** (ESI neg., MeOH): ber. für C₈₄H₁₁₆N₆O₁₃P₂: m/z 739.4043, gef.: m/z 739.4073.

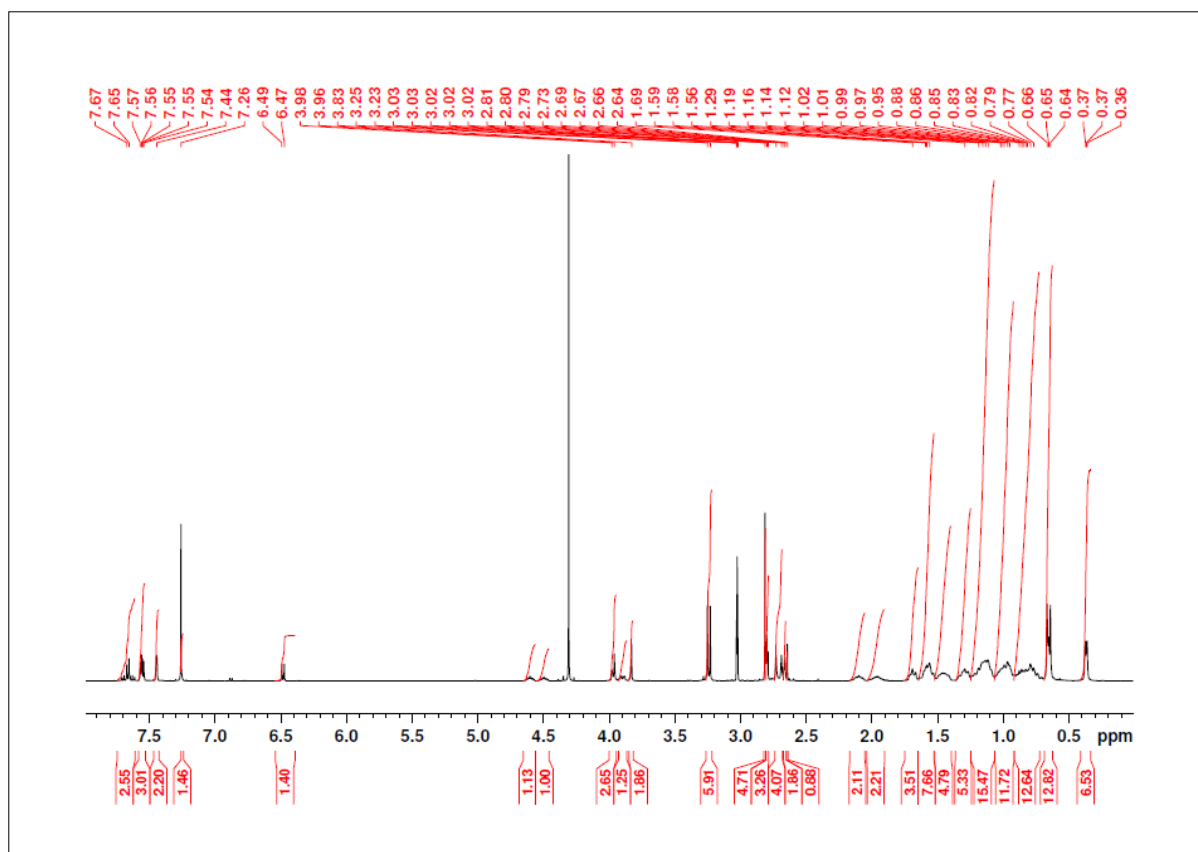


Abbildung 367: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄ = 2:1): N-DabcyI-glycin-(lithocholsäure-N-methylpropargylamid-Dimer)-BP(OLi)₂ 121.

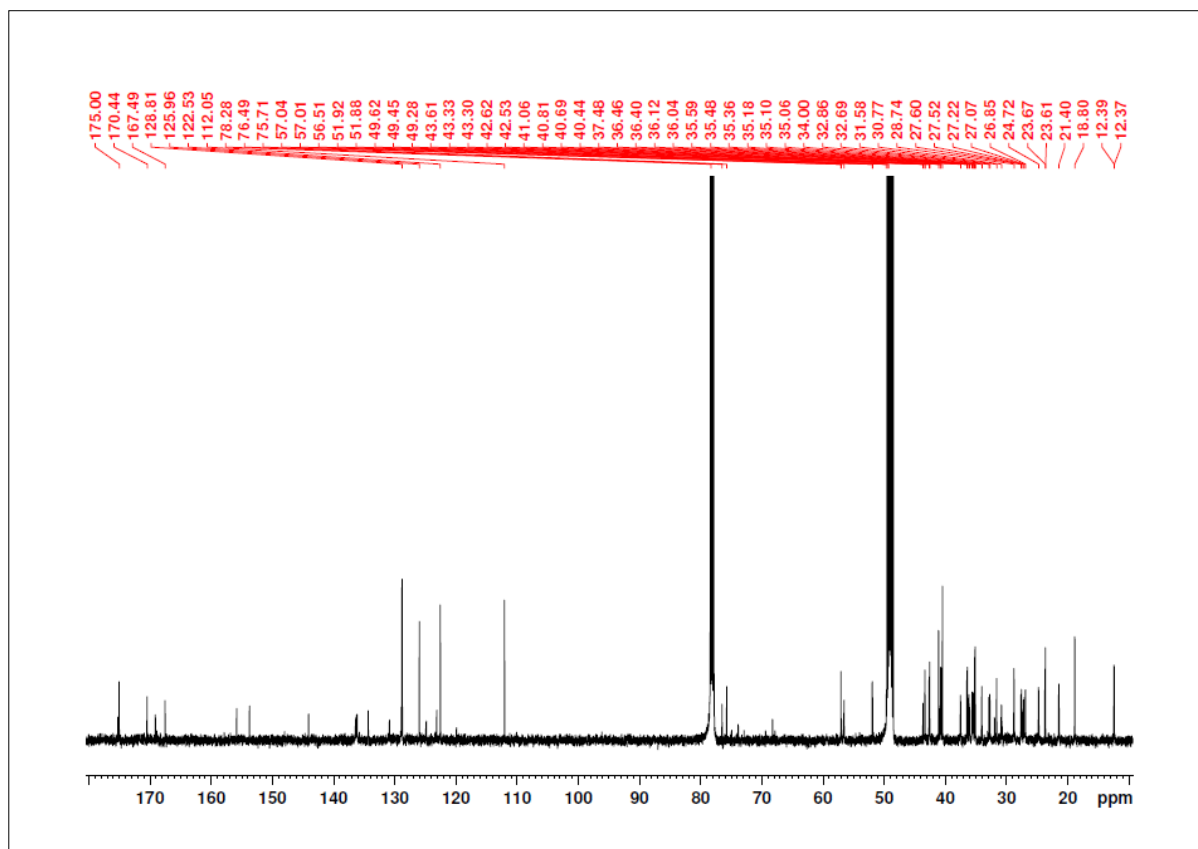
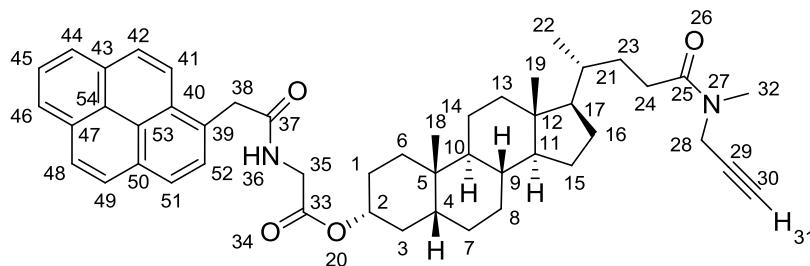


Abbildung 368: ¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄ = 2:1): N-DabcyI-glycin-(lithocholsäure-N-methylpropargylamid-Dimer)-BP(OLi)₂ 121.

5.3.5 Synthese des Rezeptors 123 mit Pyren-Einheit

5.3.5.1 *N*-(1-Pyrenessigsäure)-glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid 130



Ansatz:

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
1-Pyrenessigsäure	260.29	1.0	0.192	0.05	
73 (5.3.1.3)	595.74	0.9	0.173	0.103	
HCTU	413.69	1.2	0.231	0.095	
Cl-HOBt	169.57	2.5	0.480	0.081	
DIEA	129.25	6.0	1.153	0.149	0.201
CH ₂ Cl ₂					15.0
DMF					10.0

Durchführung:

0.05 g 1-Pyrenessigsäure (0.192 mmol, 1 eq.) wurden in 15 mL eines 2 : 1-Gemisches aus Dichlormethan und *N,N'*-Dimethylformamid gelöst. Die Lösung wurde im Eisbad auf 0 °C gekühlt und mit 0.095 g HCTU (0.231 mmol, 1.2 eq.) und 0.081 g Cl-HOBt (0.480 mmol, 2.5 eq.) versetzt. Nachdem sich eine klare Lösung gebildet hatte, wurden 0.101 mL DIEA (0.075 g, 0.577 mmol, 3 eq.) zugegeben und das gelbe Gemisch für 10 min bei 0 °C gerührt. Während der Voraktivierung fiel ein gelber feinkristalliner Feststoff aus. 0.103 g Trifluoracetat-glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid **73** (0.173 mmol, 0.9 eq.) wurden in 10 mL eines 1:1-Gemisches aus Dichlormethan und *N,N'*-Dimethylformamid gelöst und mit 0.101 mL DIEA (0.075 g, 0.577 mmol, 3 eq.) versetzt. Nach Zugabe dieses Gemischs ging der gelbe Feststoff wieder in Lösung. Das Reaktionsgemisch wurde auf Raumtemperatur erwärmt und für weitere 24 h gerührt. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels DC überprüft. Die Reaktionslösung wurde mit 20 mL Dichlormethan verdünnt. Die organische Phase wurde mit je 30 mL gesättigter NaHCO₃-Lösung, 1 M Salzsäure, und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden mit Dichlormethan gegenextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter ver-

mindertem Druck entfernt. Das gelbliche Rohprodukt (0.25 g) wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet und anschließend säulenchromatographisch gereinigt (*n*-Hexan : Ethylacetat = 1:1). Es wurden 0.109 g (1.499 mmol) eines feinkristallinen, gelben Feststoffs isoliert.

Analytik:

Ausbeute: 78 %. **R_F:** 0.44 (*n*-Hexan : Ethylacetat = 1:1). **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ = 0.61 (s, 3H, H-19), 0.87 (s, 3H, H-18), 0.92 (d, ³J_{HH} = 6.47 Hz, 3H, H-22), 0.94-1.22 (m, 9H, H-6, H-7, H-8, H-11, H-13, H-14, H-15, H-16, H-17), 1.23-1.46 (m, 8H, H-1, H-4, H-8, H-9, H-10, H-14, H-23), 1.49-1.58 (m, 2H, H-1, H-15), 1.65-1.87 (m, 5H, H-3, H-6, H-7, H-16, H-21), 1.94 (d, ³J_{HH} = 6.76 Hz, 1H, H-13), 2.19 (t, ⁴J_{HH} = 2.54 Hz, 0.8H, H-31), 2.16-2.32 (m, 1H, H-24), 2.36 (t, ⁴J_{HH} = 2.54 Hz, 0.2H, H-31), 2.32-2.46 (m, 1H, H-24), 2.98 (s, 1H, H-32), 3.06 (s, 2H, H-32), 3.89 (d, ³J_{HH} = 5.34 Hz, 2H, H-35), 4.03 (d, ⁴J_{HH} = 2.54 Hz, 0.7H, H-28), 4.21 (d, ⁴J_{HH} = 2.54 Hz, 1.3H, H-28), 4.35 (s, 2H, H-38), 4.58-4.67 (m, 1H, H-2), 5.93 (t, ³J_{HH} = 6.47 Hz, 1H, H-36), 7.94 (d, ³J_{HH} = 8.78 Hz, 1H, H-52), 8.01 (t, ³J_{HH} = 7.40 Hz, 1H, H-45), 8.04 (d, ³J_{HH} = 8.53 Hz, 1H, H-41), 8.07 (d, ³J_{HH} = 8.78 Hz, 1H, H-51), 8.14-8.17 (m, 2H, H-42, H-48), 8.19-8.20 (m, 3H, H-44, H-46, H-49). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, CDCl₃): δ = 12.2 (C19), 18.6 (C22), 20.9 (C14), 23.4 (C18), 24.3 (C15), 26.4 (C8), 26.5 (C7), 27.0 (C16), 28.4 (C24), 30.5 (C1), 30.6 (C24), 30.8 (C23), 31.2 (C32), 32.1 (C32), 34.6 (C5), 34.7 (C5), 34.8 (C6), 35.0 (C21), 35.8 (C9), 36.0 (C28), 36.5 (C3), 40.2 (C28), 40.3 (C13), 40.5 (C35), 40.7 (C10), 41.8 (C4), 41.9 (C38), 42.9 (C12), 56.2 (C17), 56.5 (C11), 71.9 (C30), 72.9 (C30), 76.0 (C2), 78.2 (C29), 78.9 (C29), 123.0 (C41), 124.7 (C54), 125.3 (C51), 125.5 (C46), 125.7 (C45), 126.4 (C42), 127.5 (C48), 127.8 (C49), 128.0 (C53), 128.6 (C52), 128.7 (C44), 129.7 (C50), 130.9 (C47), 131.3 (C43), 131.4 (C40), 134.3 (C39), 169.0 (C33), 171.6 (C37), 173.8 (C25), 174.2 (C25). **IR** (ATR): $\tilde{\nu}$ = 2982 (m), 2869 (m), 2162 (w), 2049 (w), 1979 (w), 1713 (m), 1678 (m), 1455 (m), 1402 (w), 1326 (m), 1203 (s), 1057 (s), 900 (m), 839 (m), 790 (s), 724 (m), 702 (m). **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für C₄₈H₅₉N₂O₄: m/z 727.4469, gef.: m/z 727.4538; ber. für C₄₈H₅₈N₂O₄Na: m/z 749.4289, gef.: m/z 749.4354.

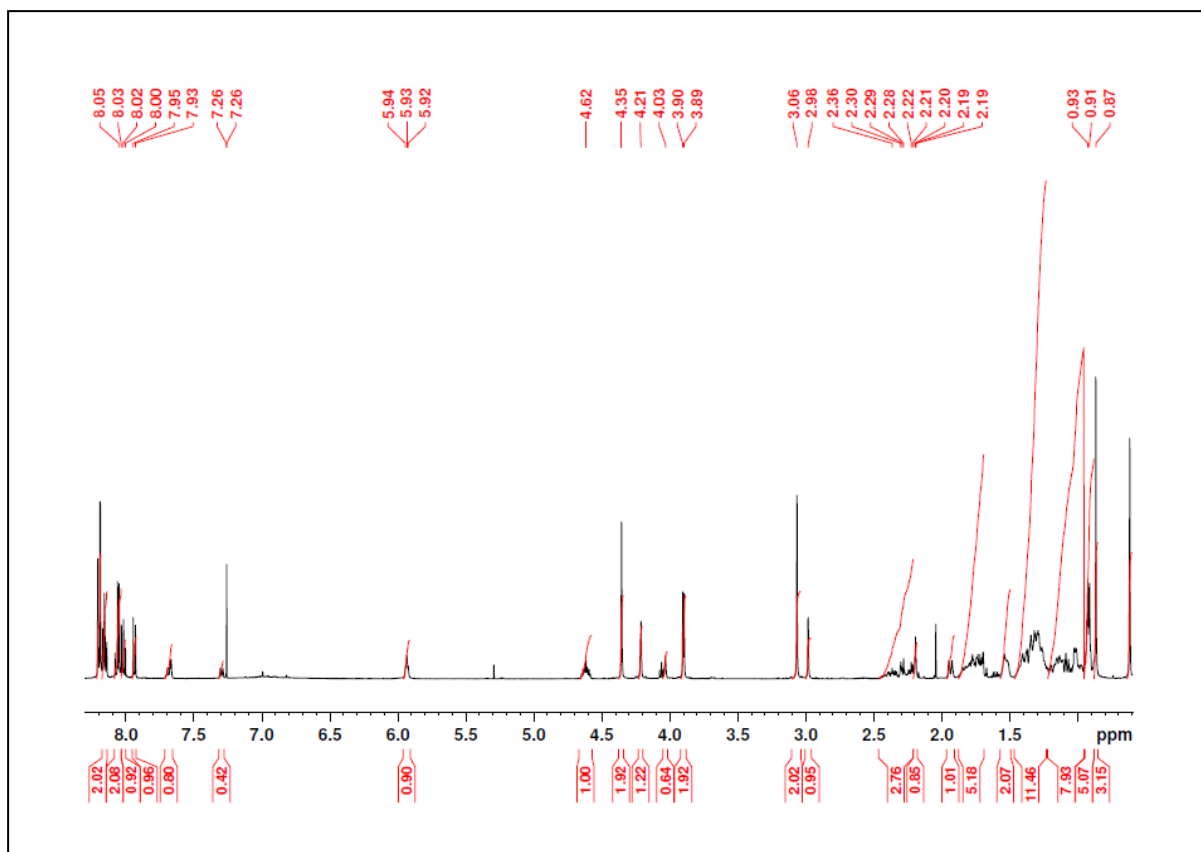


Abbildung 369: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): *N*-(1-Pyrenessigsäure)-glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid 130.

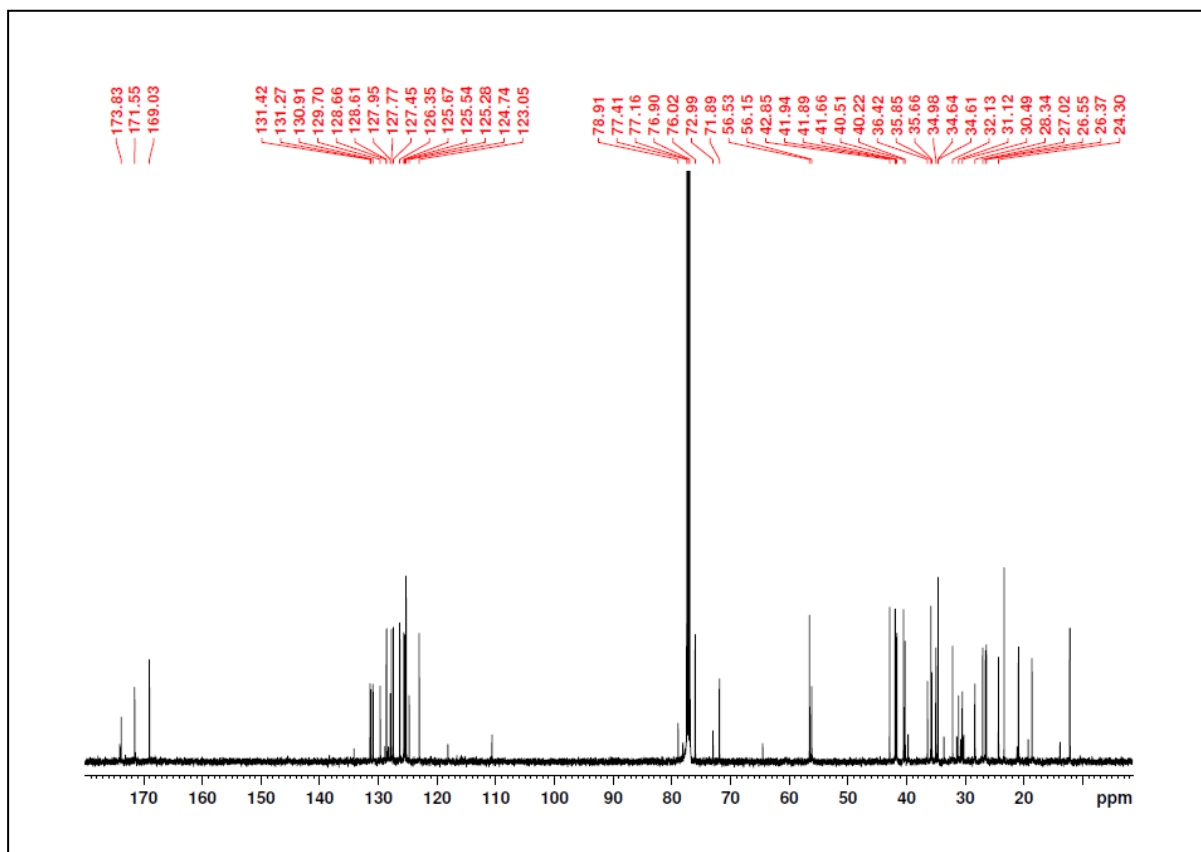
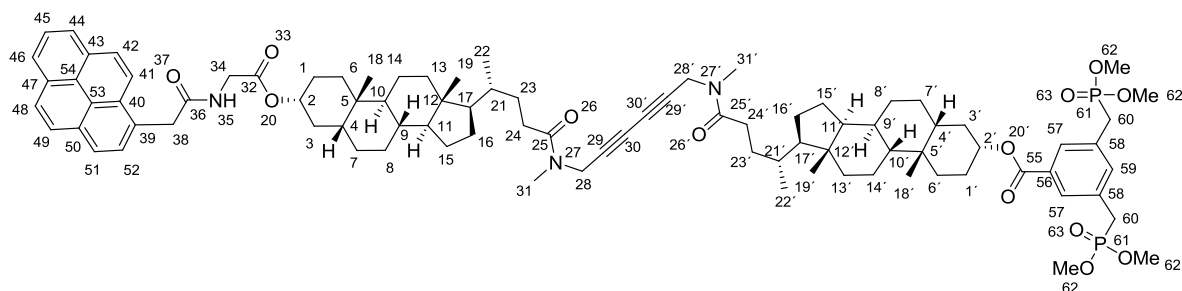


Abbildung 370: ¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃): *N*-(1-Pyrenessigsäure)-glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid 130.

5.3.5.2 *N*-(1-Pyrenessigsäure)-glycin-(lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)- BP 137



Ansatz:

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
BP-COOH 74	366.25	1.2	0.104	0.038	
131	1152.63	1.0	0.087	0.100	
HCTU	413.69	1.2	0.104	0.043	
Cl-HOBt	169.57	2.5	0.218	0.037	
DIEA	129.25	3.0	0.261	0.034	0.046
CH ₂ Cl ₂					20.0
DMF					10.0

Durchführung:

0.038 g 3,5-Bis-(dimethoxy-phosphorylmethyl)benzoesäure **74** (0.104 mmol, 1.2 eq.) wurden in 30 mL eines 2 : 1-Gemisches aus Dichlormethan und *N,N'*-Dimethylformamid gelöst. Die Lösung wurde im Eisbad auf 0 °C gekühlt und mit 0.043 g HCTU (0.104 mmol, 1.2 eq.) und 0.037 g Cl-HOBt (0.218 mmol, 2.5 eq.) versetzt. Nachdem sich eine klare Lösung gebildet hatte, wurden 0.046 mL DIEA (0.034 g, 0.261 mmol, 3 eq.) zugegeben und das gelbe Gemisch für 10 min bei 0 °C gerührt. Nach Zugabe von 0.1 g *N*-(1-Pyren-essigsäure)-glycin-(lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-OH **131** (0.087 mmol, 1 eq.) wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur aufgetaut und für weitere 40 h gerührt. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels DC überprüft. Die Reaktionslösung wurde mit 30 mL Dichlormethan verdünnt. Die organische Phase wurde mit je 60 mL gesättigter NaHCO₃-Lösung, 1 M Salzsäure und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden mit Dichlormethan gegenextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das gelbliche Rohprodukt (0.3 g) wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet und anschließend säulenchromatogra-

phisch gereinigt (Dichlormethan : Methanol = 9:1). Es wurden 0.082 g (0.071 mmol) eines feinkristallinen, gelben Feststoffs isoliert.

Analytik:

Ausbeute: 82 %. **R_F:** 0.36 (Dichlormethan : Methanol = 19:1). **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ = 0.62 (s, 3H, H-19'), 0.65 (s, 3H, H-19), 0.87 (s, 3H, H-18'), 0.92 (d, $^3J_{HH}$ = 6.36 Hz, 3H, H-22'), 0.93 (d, $^3J_{HH}$ = 6.36 Hz, 3H, H-22), 0.95 (s, 3H, H-18), 0.95-1.22 (m, 18H, H-6, H-6', H-7, H-7', H-8, H-8', H-11, H-11', H-13, H-13', H-14, H-14', H-15, H-15', H-16, H-16', H-17, H-17'), 1.23-1.47 (m, 16H, H-1, H-1', H-4, H-4', H-8, H-8', H-9, H-9', H-10, H-10', H-14, H-14', H-23, H-23'), 1.49-1.58 (m, 4H, H-1, H-1', H-15, H-15'), 1.67-1.88 (m, 10H, H-3, H-3', H-6, H-6', H-7, H-7', H-16, H-16', H-21, H-21'), 1.94 (m, 2H, H-13, H-13'), 2.15-2.29 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.30-2.43 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.96 (s, 1H, H-31, H-31'), 3.04 (s, 4H, H-31, H-31'), 2.20 (d, $^2J_{PH}$ = 21.8 Hz, 4H, H-60), 3.69 (d, $^2J_{PH}$ = 10.8 Hz, 12H, H-62), 3.89 (d, $^3J_{HH}$ = 5.28 Hz, 2H, H-34), 4.09 (s, 1.4H, H-28, H-28'), 4.28 (s, 2.6H, H-28, H-28'), 4.35 (s, 2H, H-38), 4.58-4.64 (m, 1H, H-2), 4.91-4.97 (m, 1H, H-2'), 5.86 (t, $^3J_{HH}$ = 6.47 Hz, 1H, H-35), 7.45 (s, 1H, H-59), 7.84 (d, $^4J_{HH}$ = 1.89 Hz, 2H, H-57), 7.95 (d, $^3J_{HH}$ = 8.08 Hz, 1H, H-52), 8.02 (t, $^3J_{HH}$ = 7.96 Hz, 1H, H-45), 8.05 (d, $^3J_{HH}$ = 8.95 Hz, 1H, H-41), 8.07 (d, $^3J_{HH}$ = 8.95 Hz, 1H, H-51), 8.15-8.18 (m, 2H, H-42, H-48), 8.19-8.22 (m, 3H, H-44, H-46, H-49). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, CDCl₃): δ = 12.5 (C19), 12.6 (C19'), 19.0 (C22, C22'), 21.5 (C14), 21.6 (C14'), 23.7 (C18), 23.8 (C18'), 24.9 (C15, C15'), 27.0 (C8, C8'), 27.1 (C7, C7'), 27.2 (C16, C16'), 27.4 (C24, C24'), 27.6 (C1, C1'), 27.8 (C24, C24'), 30.0 (C23, C23'), 31.8 (C31, C31'), 32.7 (C31, C31'), 33.0 (C60), 34.2 (C5, C5'), 34.4 (C5, C5'), 35.2 (C6, C6'), 35.6 (C21, C21'), 36.3 (C9, C9'), 36.6 (C28, C28'), 37.7 (C3, C3'), 40.9 (C28, C28'), 41.2 (C13, C13'), 41.4 (C34), 42.5 (C10, C10'), 42.7 (C4, C4'), 42.8 (C38), 43.5 (C12, C12'), 52.1 (d, $^2J_{PC}$ = 6.8 Hz, C62), 56.7 (C17, C17'), 57.2 (C11, C11'), 72.2 (C30, C30'), 75.8 (C30, C30'), 76.6 (C2, C2'), 78.9 (C29, C29'), 79.4 (C29, C29'), 123.9 (C41), 125.4 (C54), 125.7 (C51), 125.8 (C46), 125.9 (C45), 126.1 (C42), 126.8 (C48), 128.0 (C49), 128.1 (C53), 129.0 (C52), 129.2 (C44), 129.3 (C50), 130.4 (C57), 131.0 (C47), 131.6 (C43), 131.7 (C40), 132.1 (C56, C58), 135.3 (C39), 136.5 (C59), 167.7 (C55), 170.2 (C33), 173.5 (C36), 175.2 (C25), 175.4 (C25). **³¹P-NMR** (121.5 MHz, CDCl₃): δ = 28.2. **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für C₈₉H₁₂₀N₃O₁₃P₂: m/z 1500.8291, gef.: m/z 1500.8281; ber. für C₈₉H₁₁₉N₃O₁₃P₂Na: m/z 1522.8110, gef.: m/z 1522.8141.

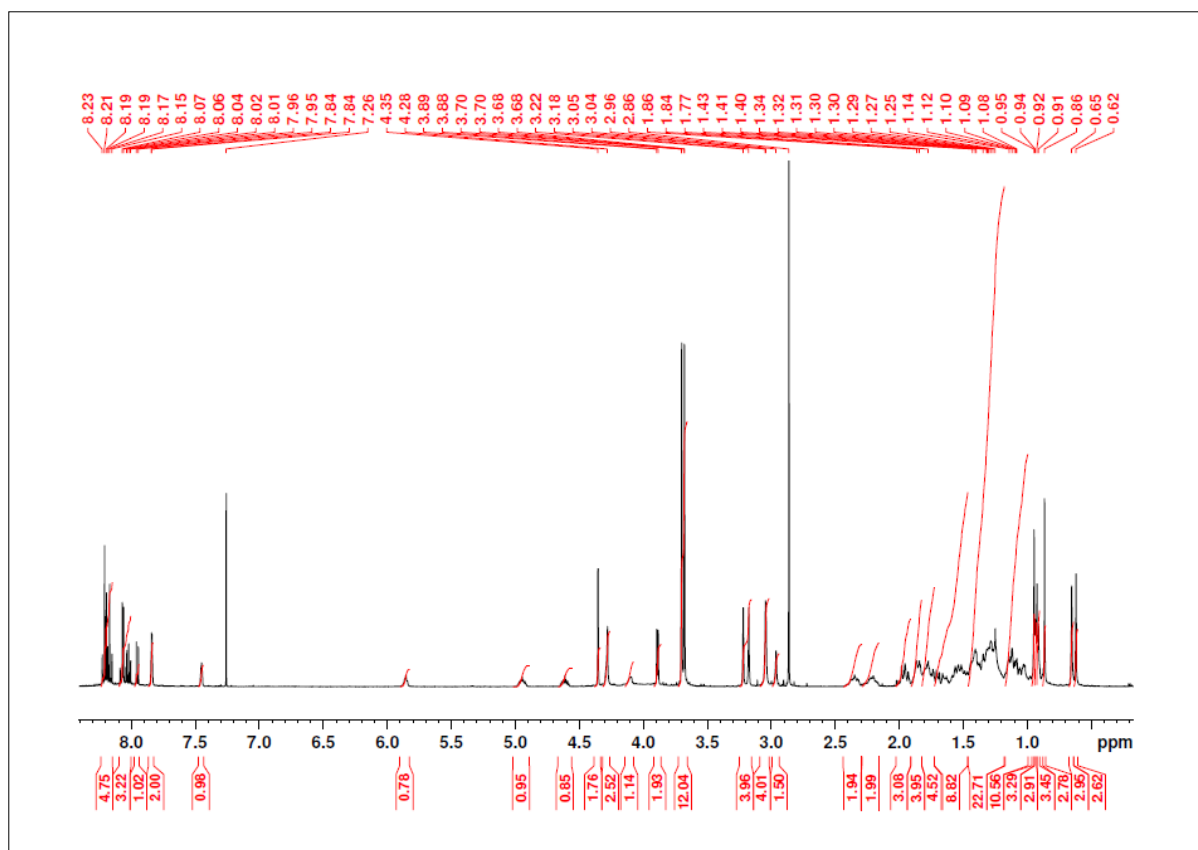


Abbildung 371: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): *N*-(1-Pyrenessigsäure)-glycin-(lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-BP 137.

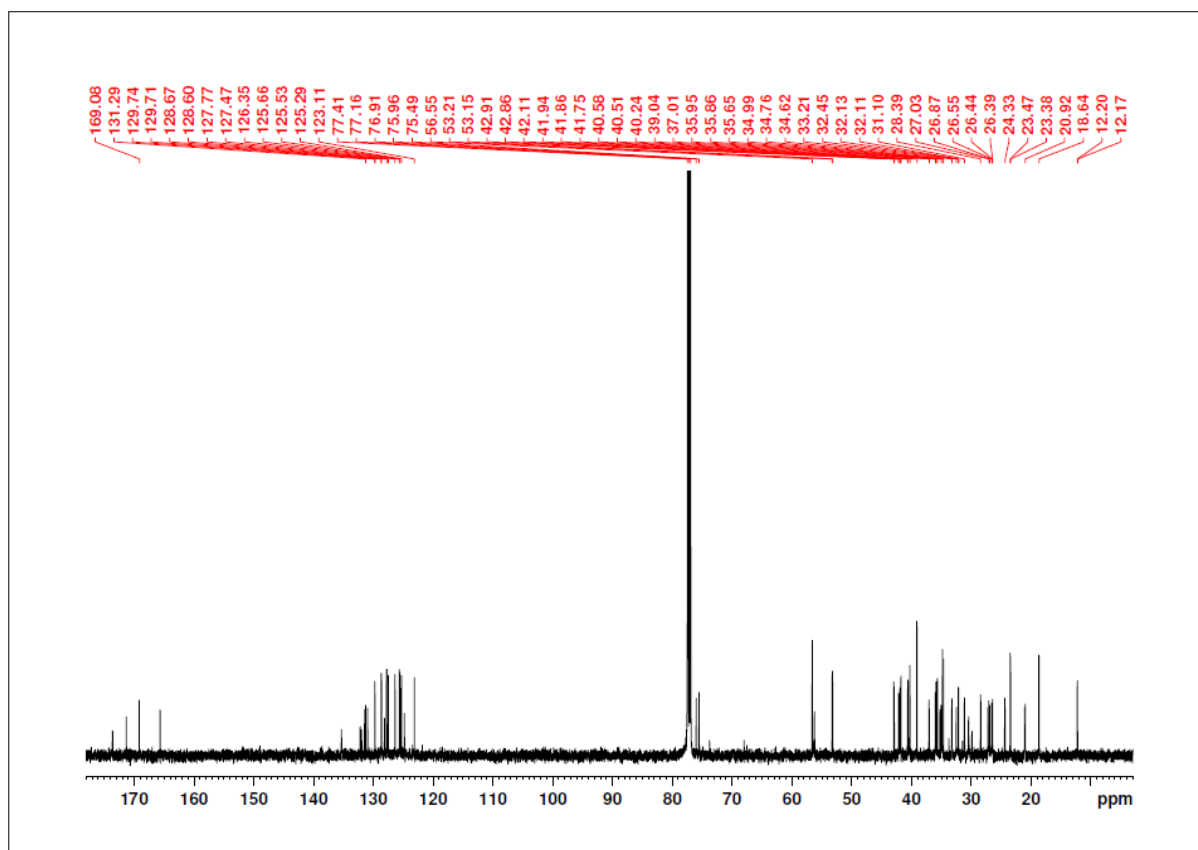
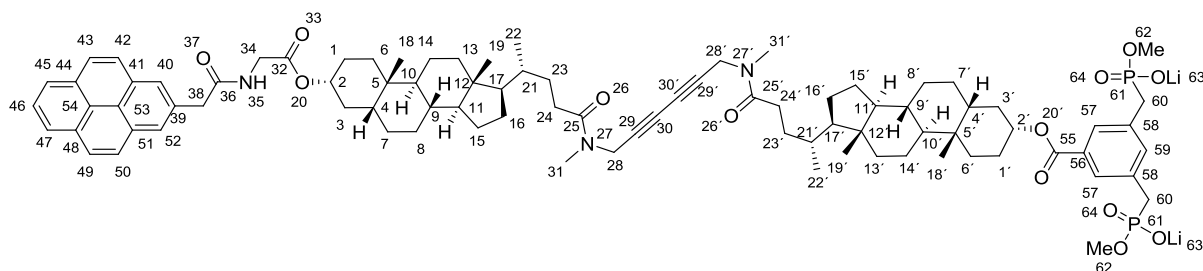


Abbildung 372: ¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃): *N*-(1-Pyrenessigsäure)-glycin-(lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-BP 137.

5.3.5.3 *N*-(1-Pyrenessigsäure)-glycin-(lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-BP(OLi)₂ 123



Ansatz:

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
137 (5.3.5.2)	1500.86	1.0	0.013	0.02	
LiBr	86.84	2.2	0.029	0.0025	
CH ₃ CN					10.0

Durchführung:

0.02 g *N*-(1-Pyrenessigsäure)-glycin-(lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-BP **137** (0.013 mmol, 1 eq.) wurden in 10 mL Acetonitril gelöst und mit 0.0025 g wasserfreiem LiBr (0.029 mmol, 2.2 eq.) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 24 h unter Rückfluss erhitzt. Dabei fiel das Produkt als gelber Feststoff aus. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels DC überprüft. Nach vollständiger Umsetzung des Edukts wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur gekühlt und der Feststoff samt Reaktionslösung in ein Zentrifugenglas überführt. Der erhaltene Feststoff wurde abgetrennt und vier Mal mit je 10 mL Acetonitril, einmal mit Diethylether gewaschen. Das gelbe Produkt (0.018 g, 0.012 mmol) wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Analytik:

Ausbeute: 98 %. **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄ = 1:1): δ = 0.62 (s, 3H, H-19'), 0.65 (s, 3H, H-19), 0.87 (s, 3H, H-18'), 0.92 (d, $^3J_{HH}$ = 6.36 Hz, 3H, H-22'), 0.93 (d, $^3J_{HH}$ = 6.36 Hz, 3H, H-22), 0.95 (s, 3H, H-18), 0.95-1.22 (m, 18H, H-6, H-6', H-7, H-7', H-8, H-8', H-11, H-11', H-13, H-13', H-14, H-14', H-15, H-15', H-16, H-16', H-17, H-17'), 1.23-1.47 (m, 16H, H-1, H-1', H-4, H-4', H-8, H-8', H-9, H-9', H-10, H-10', H-14, H-14', H-23, H-23'), 1.49-1.58 (m, 4H, H-1, H-1', H-15, H-15'), 1.67-1.88 (m, 10H, H-3, H-3', H-6, H-6', H-7, H-7', H-16, H-16', H-21, H-21'), 1.94 (m, 2H, H-13, H-13'), 2.15-2.29 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.30-2.43 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.96 (s, 1H, H-31, H-31'), 3.04 (s, 4H, H-31, H-31'), 2.20 (d, $^2J_{PH}$ = 21.8 Hz, 4H, H-60), 3.69 (d, $^2J_{PH}$ = 10.8 Hz, 12H, H-62), 3.89 (d, $^3J_{HH}$ = 5.28 Hz, 2H, H-34), 4.09 (s, 1.4H, H-28, H-28'), 4.28 (s, 2.6H, H-28, H-28'), 4.35 (s, 2H, H-38), 4.58-4.64 (m, 1H, H-2), 4.91-4.97 (m, 1H, H-2'), 5.86 (t, $^3J_{HH}$ = 6.47 Hz, 1H, H-35), 7.45 (s, 1H, H-59), 7.84 (d, $^4J_{HH}$ = 1.89 Hz, 2H, H-57), 7.95 (d, $^3J_{HH}$ = 8.08 Hz, 1H, H-52), 8.02 (t, $^3J_{HH}$ = 7.96 Hz, 1H, H-45), 8.05 (d, $^3J_{HH}$ = 8.95 Hz, 1H, H-41), 8.07 (d, $^3J_{HH}$ = 8.95 Hz, 1H, H-51), 8.15-8.18 (m, 2H, H-42, H-48), 8.19-8.22 (m, 3H, H-44, H-46, H-49). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄ = 1:1): δ = 12.5 (C19), 12.6 (C19'), 19.0 (C22, C22'), 21.5 (C14), 21.6 (C14'), 23.7 (C18), 23.8 (C18'), 24.9 (C15, C15'), 27.0 (C8, C8'), 27.1 (C7, C7'), 27.2 (C16, C16'), 27.4 (C24, C24'), 27.6 (C1, C1'), 27.8 (C24, C24'), 30.0 (C23, C23'), 31.8 (C31, C31'), 32.7 (C31, C31'), 33.0 (C60), 34.2 (C5, C5'), 34.4 (C5, C5'), 35.2 (C6, C6'), 35.6 (C21, C21'), 36.3 (C9, C9'), 36.6 (C28, C28'), 37.7 (C3, C3'), 40.9 (C28, C28'), 41.2 (C13, C13'), 41.4 (C34), 42.5 (C10, C10'), 42.7 (C4, C4'), 42.8 (C38), 43.5 (C12, C12'), 52.1 (d, $^2J_{PC}$ = 6.8 Hz, C62), 56.7 (C17, C17'), 57.2 (C11, C11'), 72.2 (C30, C30'), 75.8 (C30, C30'), 76.6 (C2, C2'), 78.9 (C29, C29'), 79.4 (C29, C29'), 123.9 (C41), 125.4 (C54), 125.7 (C51), 125.8 (C46), 125.9 (C45), 126.1 (C42), 126.8 (C48), 128.0 (C49), 128.1 (C53), 129.0 (C52), 129.2 (C44), 129.3 (C50), 130.4 (C57), 131.0 (C47), 131.6 (C43), 131.7 (C40), 132.1 (C56, C58), 135.3 (C39), 136.5 (C59), 167.7 (C55), 170.2 (C33), 173.5 (C36), 175.2 (C25), 175.4 (C25). **HRMS** (ESI neg., MeOH): ber. für C₈₇H₁₁₃N₃O₁₃P₂: m/z 735.8912, gef.: m/z 735.8921.

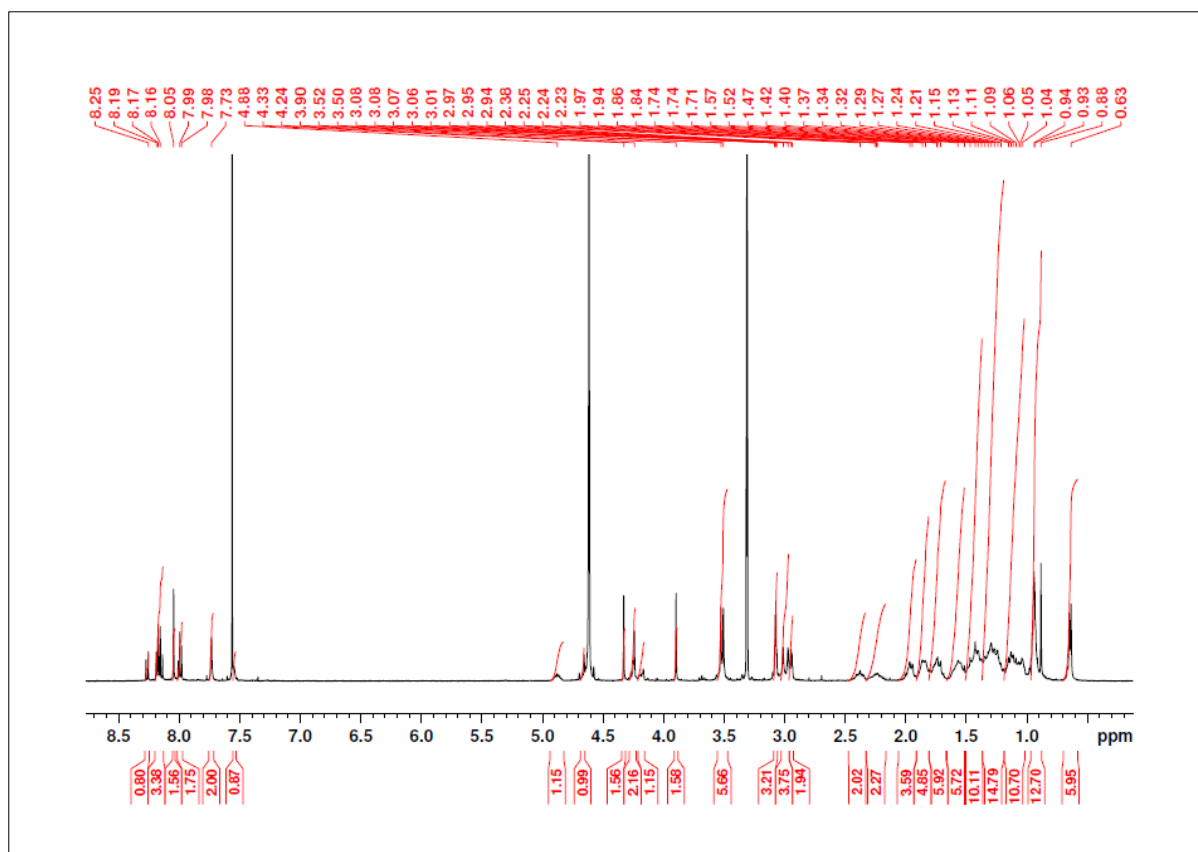


Abbildung 373: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄ = 1:1): *N*-(1-Pyrenessigsäure)-glycin-(lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-BP(OLi)₂ 123.

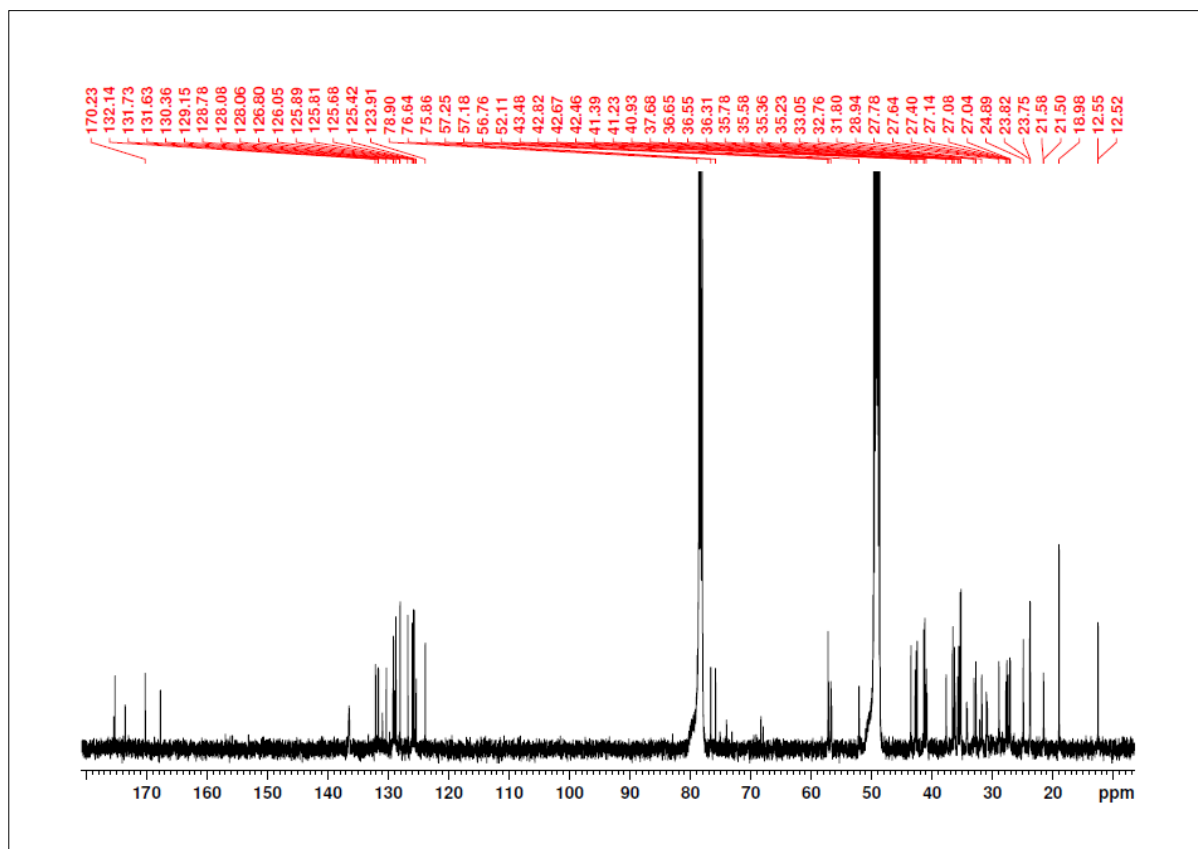
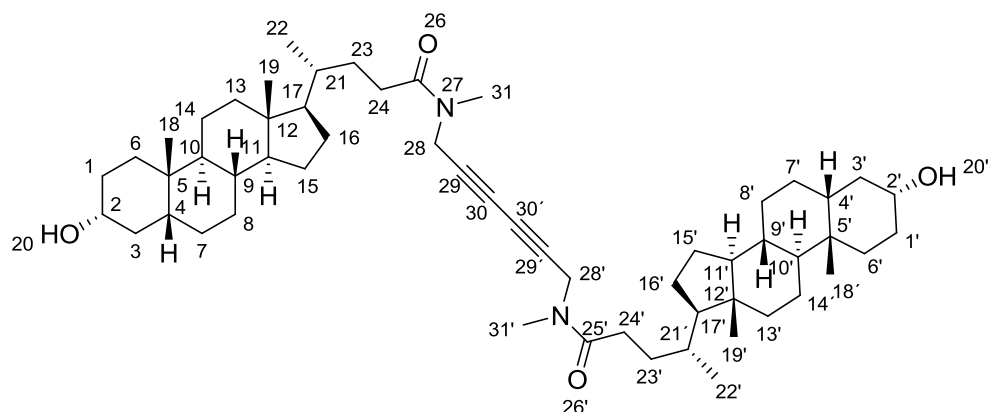


Abbildung 374: ¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄ = 1:1): *N*-(1-Pyrenessigsäure)-glycin-(lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-BP(OLi)₂ 123.

5.3.6 Synthese der symmetrischen Transmembranbausteine

5.3.6.1 (Lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid)-Dimer 95



Ansatz:

Nebenprodukt der Synthese (5.3.1.20).

Durchführung:

Siehe Synthese (5.3.1.20).

Analytik:

Ausbeute: 21 %. **R_F:** 0.11 (*n*-Hexan : Ethylacetat = 1:1), 0.25 (*n*-Hexan : Ethylacetat = 2:5).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 0.62 (s, 6H, H-19, H-19'), 0.90 (s, 6H, H-18, H-18'), 0.92 (d, ³J_{HH} = 6.40 Hz, 6H, H-22, H-22'), 0.93-0.99 (m, 2H, H-6, H-6'), 1.01-1.24 (m, 16H, H-7, H-7', H-8, H-8', H-11, H-11', H-13, H-13', H-14, H-14', H-15, H-15', H-16, H-16', H-17, H-17'), 1.26-1.41 (m, 16H, H-1, H-1', H-4, H-4', H-8, H-8', H-9, H-9', H-10, H-10', H-14, H-14', H-23, H-23'), 1.45-1.50 (m, 2H, H-3, H-3'), 1.51-1.56 (m, 2H, H-15, H-15'), 1.60-1.63 (m, 2H, H-1, H-1'), 1.70-1.86 (m, 10H, H-3, H-3', H-6, H-6', H-7, H-7', H-16, H-16', H-21, H-21'), 1.91-1.95 (m, 2H, H-13, H-13'), 2.06 (bs, 2H, H-20, H-20'), 2.14-2.27 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.30-2.42 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.95 (s, 2H, H-31, H-31'), 3.03 (s, 4H, H-31, H-31'), 3.55-3.61 (m, 2H, H-2, H-2'), 4.09 (s, 1.2H, H-28, H-28'), 4.28 (s, 2.8H, H-28, H-28'). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, CDCl₃): δ = 12.2 (C19, C19'), 18.6 (C22, C22'), 20.9 (C14, C14'), 23.5 (C18, C18'), 24.3 (C15, C15'), 26.5 (C8, C8'), 27.3 (C7, C7'), 28.4 (C16, C16'), 30.2 (C24, C24'), 30.4 (C1, C1'), 30.7 (C24, C24'), 31.1 (C23, C23'), 31.4 (C23, C23'), 33.7 (C31, C31'), 34.7 (C31, C31'), 34.8 (C6, C6'), 35.5 (C21, C21'), 35.6 (C5, C5'), 35.9 (C9, C9'), 36.5 (C28, C28'), 36.6 (C3, C3'), 40.2 (C28, C28'), 40.3 (C13, C13'), 40.5 (C10, C10'), 42.2 (C4, C4'), 42.8 (C12, C12'), 56.1 (C17, C17'), 56.5 (C11, C11'), 68.7 (C30, C30'), 69.3 (C30, C30'), 69.3 (C29, C29'), 73.4 (C2, C2'), 78.2 (C29, C29'), 173.5 (C25, C25'). **IR** (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3412 (w), 2927 (m), 2862 (m), 2361 (w), 1980 (w), 1726 (w), 1643 (s), 1447 (s), 1397 (m), 1335 (m), 1258 (m), 1196 (m), 1166 (m), 1115 (m), 1069 (m), 1041 (s), 1114 (m), 911 (m), 728 (s). **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für C₅₆H₈₉N₂O₄: m/z 853.6817, gef.: m/z 853.6874; ber. für C₅₆H₈₈N₂O₄Na: m/z 875.6636, gef.: m/z 875.6697.

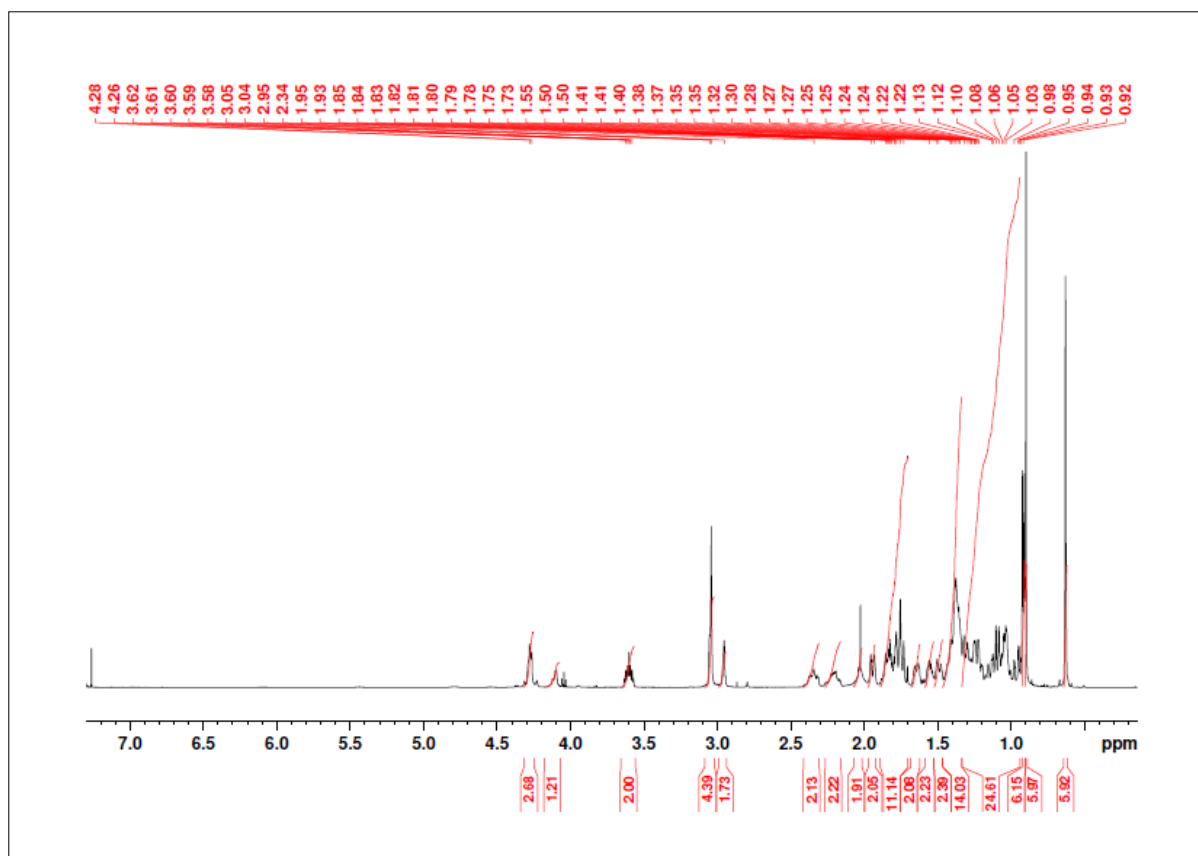


Abbildung 375: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): (Lithocholsäure-N-methylpropargylamid)-Dimer 95.

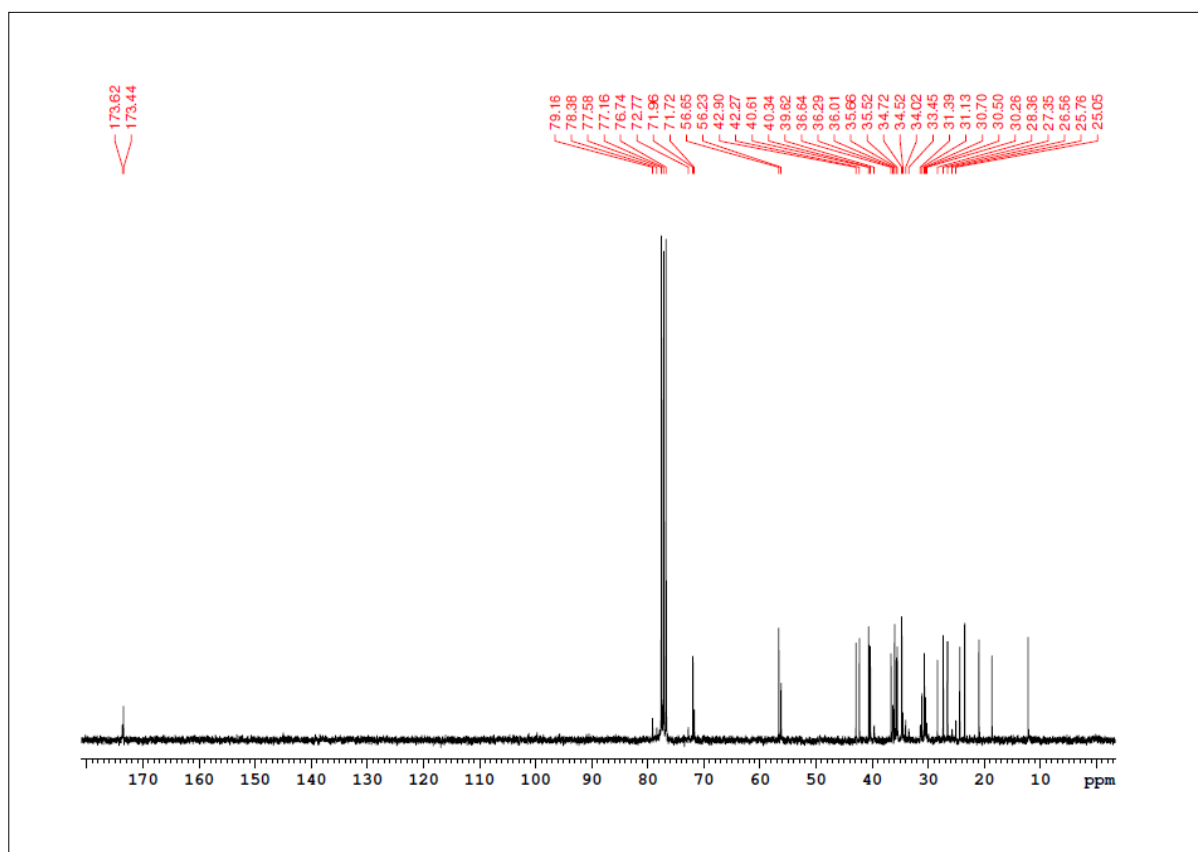
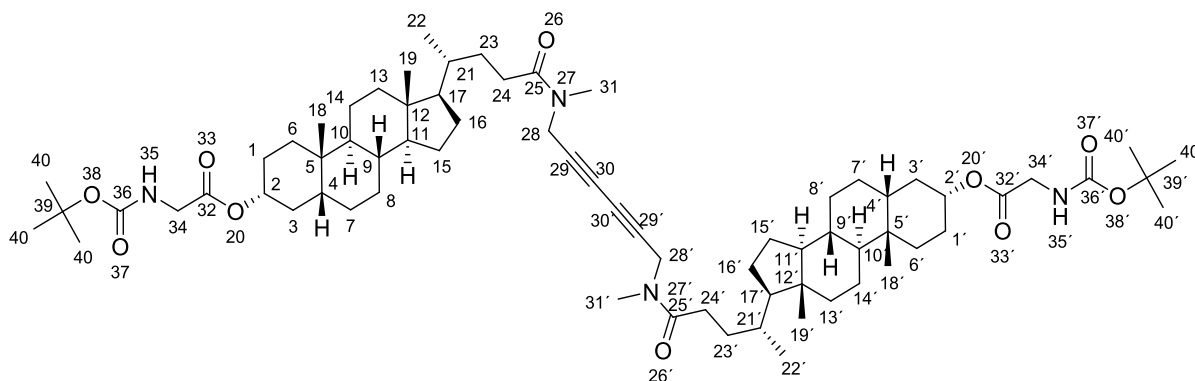


Abbildung 376: ¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃): (Lithocholsäure-N-methylpropargylamid)-Dimer 95.

5.3.6.2 (*N*-Boc-glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid)-Dimer **87**



Ansatz:

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
72 (5.3.1.2)	584.83	1.0	0.175	0.1	
CuCl	99.00	4.0	0.700	0.069	
TMEDA	116.20	4.0	0.700	0.081	0.106
CH ₂ Cl ₂					10.0

Durchführung:

a) 0.1 g *N*-Boc-glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid **72** (0.175 mmol, 1 eq.) wurden in 15 mL Dichlormethan gelöst. Zu dieser Lösung wurde 0.069 g Kupfer(I)chlorid (0.7 mmol, 4 eq.) und 0.106 mL *N,N,N',N'*-Tetramethylethylendiamin (0.081 g, 0.7 mmol, 4 eq.) zugegeben. Es wurde solange bei Raumtemperatur gerührt, bis das Kupfer(I)chlorid vollständig in Lösung gegangen war. Hierbei färbte sich die Lösung hellgrün. Danach wurde die Atmosphäre über der Reaktionslösung mit Sauerstoff gesättigt. Die tiefblaue Lösung wurde weitere 5 h bei Raumtemperatur gerührt und der Reaktionsverlauf mittels DC überprüft. Nach vollständiger Umsetzung der Edukte wurde das Reaktionsgemisch auf 50 mL gesättigte Ammoniumchlorid-Lösung gegossen, die organische Phase abgetrennt und zwei weitere Male mit gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden mit Dichlormethan gegenextrahiert und die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet. Das Trocknungsmittel wurde abgetrennt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Dichlormethan : Methanol = 19:1). Es konnten 0.097 g (0.083 mmol) des Dimers **87** in Form eines farblosen, feinkristallinen Feststoffs isoliert werden.

b) Es konnten 0.040 g (0.034 mmol) (*N*-Boc-glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid)-Dimer **87** als Nebenprodukt der Glaser-Hay-Kupplung (Synthese 5.3.1.8) isoliert werden.

Analytik:

Ausbeute: 95%. **R_F:** 0.48 (Dichlormethan : Methanol = 19:1). **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ = 0.64 (s, 6H, H-19, H-19'), 0.92 (m, 12H, H-18, H-18', H-22, H-22'), 0.92-0.99 (m, 2H, H-6, H-6'), 1.03-1.23 (m, 16H, H-7, H-7', H-8, H-8', H-11, H-11', H-13, H-13', H-14, H-14', H-15, H-15', H-16, H-16', H-17, H-17'), 1.25-1.43 (m, 16H, H-1, H-1', H-4, H-4', H-8, H-8', H-9, H-9', H-10, H-10', H-14, H-14', H-23, H-23'), 1.45 (s, 18H, H-40, H-40'), 1.45-1.49 (m, 2H, H-3, H-3'), 1.51-1.55 (m, 2H, H-15, H-15'), 1.60-1.63 (m, 2H, H-1, H-1'), 1.69-1.87 (m, 10H, H-3, H-3', H-6, H-6', H-7, H-7', H-16, H-16', H-21, H-21'), 1.90-1.93 (m, 2H, H-13, H-13'), 2.13-2.29 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.31-2.52 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.97 (s, 2H, H-31, H-31'), 3.05 (s, 4H, H-31, H-31'), 3.86 (d, $^3J_{HH} = 5.22$ Hz, 4H, H-34, H-34'), 4.11 (s, 1.4H, H-28, H-28'), 4.29 (s, 2.6H, H-28, H-28'), 4.72-4.85 (m, 2H, H-2, H-2'), 5.00 (s, 2H, H-35, H-35'). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, CDCl₃): δ = 12.3 (C19, C19'), 18.7 (C22, C22'), 21.1 (C14, C14'), 23.5 (C18, C18'), 24.4 (C15, C15'), 26.5 (C8, C8'), 26.9 (C7, C7'), 27.2 (C16, C16'), 28.3 (C40, C40'), 30.2 (C24, C24'), 30.9 (C1, C1'), 31.2 (C24, C24'), 31.3 (C23, C23'), 32.1 (C23, C23'), 33.5 (C31, C31'), 34.5 (C31, C31'), 34.6 (C5, C5'), 34.9 (C6, C6'), 35.5 (C21, C21'), 35.7 (C9, C9'), 35.9 (C28, C28'), 36.8 (C3, C3'), 38.6 (C28, C28'), 40.1 (C13, C13'), 40.4 (C10, C10'), 41.9 (C4, C4'), 42.7 (C34, C34'), 42.8 (C12, C12'), 56.0 (C17, C17'), 56.4 (C11, C11'), 67.6 (C30, C30'), 67.8 (C30, C30'), 73.4 (C2, C2'), 73.6 (C29, C29'), 75.6 (C29, C29'), 79.8 (C39, C39'), 155.7 (C36, C36'), 169.8 (C32, C32'), 173.3 (C25, C25'), 173.4 (C25, C25'). **IR** (ATR): $\tilde{\nu}$ = 2930 (m), 2862 (m), 2162 (w), 2036 (w), 1979 (w), 1714 (m), 1651 (m), 1514 (m), 1450 (m), 1388 (m), 1364 (m), 1248 (m), 1202 (m), 1162 (s), 1054 (m), 1024 (m), 986 (m), 951 (m), 893 (w), 864 (w), 781 (w). **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für C₇₀H₁₁₀N₄O₁₀Na: m/z 1189.8114, gef.: m/z 1189.8202.

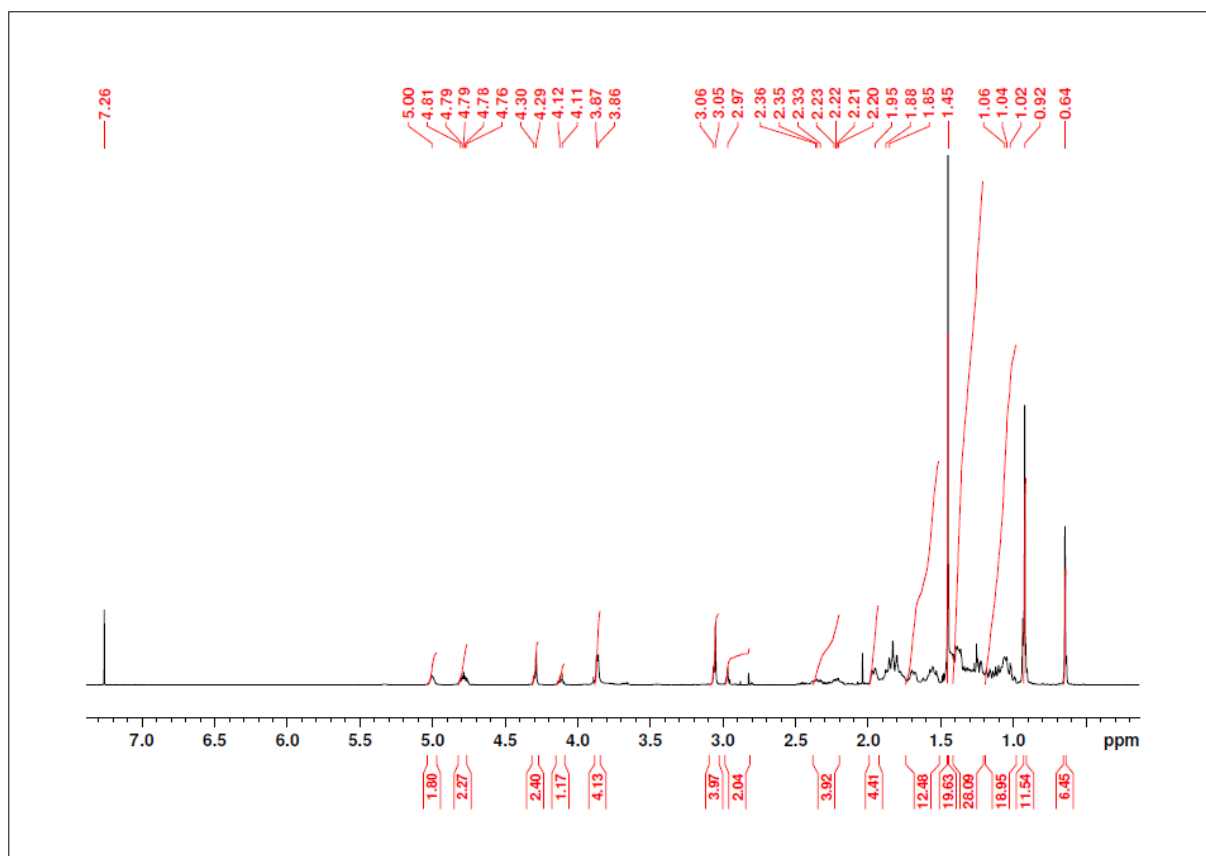


Abbildung 377: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): (N-Boc-glycin-lithocholsäure-N-methylpropargylamid)-Dimer 87.

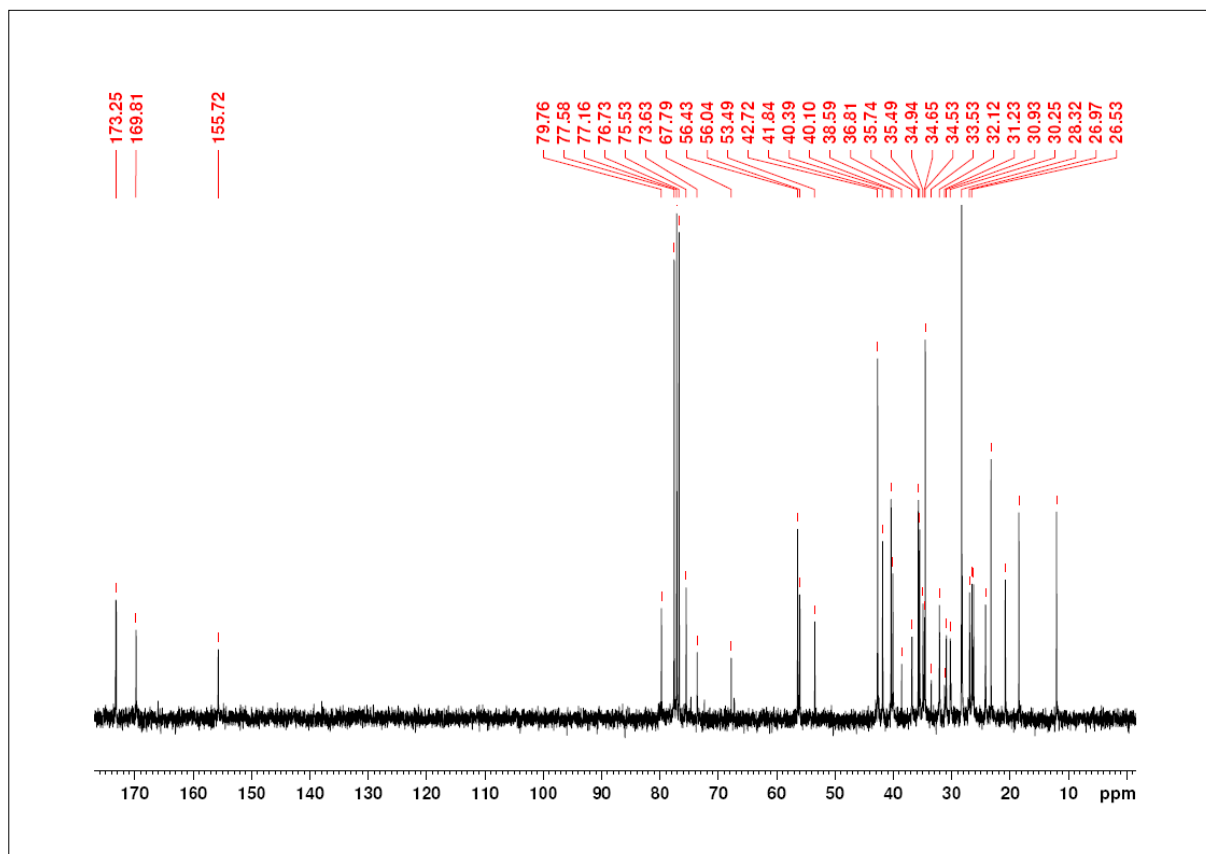
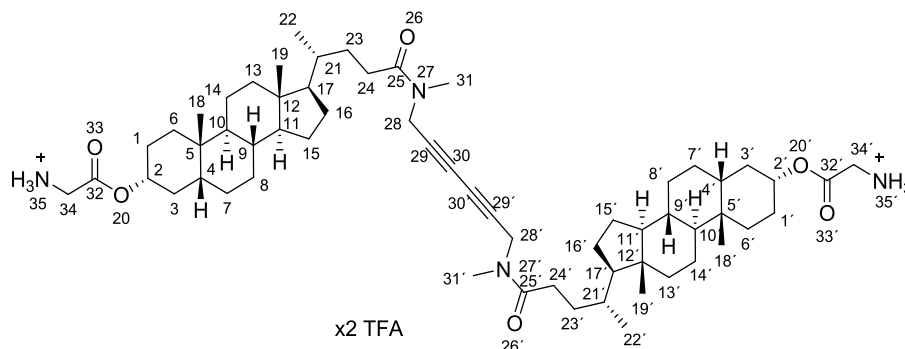


Abbildung 378: ¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃): (N-Boc-glycin-lithocholsäure-N-methylpropargylamid)-Dimer 87.

5.3.6.3 (Trifluoracetat-glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid)-Dimer 88Ansatz:

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
87 (5.3.6.2)	1167.64	1.0	0.086	0.100	
TFA					2.0
CH ₂ Cl ₂					10.0
Benzol					40.0

Durchführung:

0.10 g (0.086 mmol) (Boc-*N*-glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid)-Dimer **87** wurden in 10 mL Dichlormethan gelöst und mit 2 mL Trifluoressigsäure versetzt. Die Reaktionslösung wurde 6 h bei Raumtemperatur gerührt und der Reaktionsfortschritt mittels DC überprüft. Die Lösung wurde mit 10 mL absolutem Benzol verdünnt und anschließend am Rotationsverdampfer auf 2 mL eingengt. Das so erhaltene Konzentrat wurde dreimal mit je 10 mL Benzol aufgenommen und wiederum eingengt, um die überschüssige Trifluoressigsäure im azeotropen Gemisch vollständig zu entfernen. Das Produkt wurde 48 h im Ölpumpenvakuum getrocknet. Es konnten 0.102 g (0.086 mmol) eines farblosen, hochviskosen Öls erhalten werden.

Analytik:

Ausbeute: 99 %. **R_F:** 0.1 (Dichlormethan : Methanol = 5:1). **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄ = 5:1): δ = 0.59 (s, 6H, H-19, H-19'), 0.88 (m, 12H, H-18, H-18', H-22, H-22'), 0.95-1.02 (m, 2H, H-6, H-6'), 1.05-1.26 (m, 16H, H-7, H-7', H-8, H-8', H-11, H-11', H-13, H-13', H-14, H-14', H-15, H-15', H-16, H-16', H-17, H-17'), 1.27-1.46 (m, 16H, H-1, H-1', H-4, H-4', H-8, H-8', H-9, H-9', H-10, H-10', H-14, H-14', H-23, H-23'), 1.48-1.51 (m, 2H, H-3, H-3'), 1.55-1.58 (m, 2H, H-15, H-15'), 1.63-1.67 (m, 2H, H-1, H-1'), 1.72-2.01 (m, 10H, H-3, H-3', H-6, H-6', H-7, H-7', H-16, H-16', H-21, H-21'), 1.94-1.96 (m, 2H, H-13, H-13'), 2.08-2.25 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.26-2.39 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.89 (s, 1H, H-31), 3.01 (s, 2H, H-31), 3.64 (s, 4H, H-34, H-34'), 4.08 (s, 1.4H, H-28, H-28'), 4.20 (s, 2.6H, H-28, H-28'), 4.71-4.83 (m, 2H, H-2, H-2'). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, MeOD-*d*₄): δ = 12.6 (C19, C19'), 19.1 (C22, C22'), 22.0 (C14, C14'), 23.9 (C18, C18'), 24.2 (C15, C15'), 26.2 (C8, C8'), 26.9 (C7, C7'), 27.7 (C16, C16'), 29.5 (C24, C24'), 30.3 (C1, C1'), 31.1 (C24, C24'), 31.4 (C23, C23'), 31.8 (C31, C31'), 33.3 (C31, C31'), 34.9 (C5, C5'), 35.8 (C5, C5'), 35.8 (C6, C6'), 36.1 (C21, C21'), 37.0 (C9, C9'), 37.3 (C28, C28'), 37.4 (C3, C3'), 40.3 (C28, C28'), 41.3 (C13, C13'), 42.0 (C34, C34'), 43.4 (C10, C10'), 44.0 (C4, C4'), 44.1 (C12, C12'), 57.6 (C17, C17'), 58.0 (C11, C11'), 68.7 (C30, C30'), 69.3 (C30, C30'), 69.3 (C29, C29'), 73.4 (C2, C2'), 78.2 (C29, C29'), 129.5 (C37, C37'), 130.0 (C36, C36'), 168.1 (C32, C32'), 176.3 (C25, C25'), 176.5 (C25, C25'). **IR** (ATR): $\tilde{\nu}$ = 2931 (m), 2862 (m), 2360 (w), 1748 (m), 1678 (m), 1633 (m), 1450 (m), 1403 (m), 1380 (w), 1336 (w), 1241 (s), 1201 (s), 1164 (s), 1054 (m), 975 (m), 913 (m), 833 (m), 797 (s), 721 (s), 703 (m), 679 (m). **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für C₆₀H₉₆N₄O₆: m/z 967.7246, 484.3659 gef.: m/z 967.7343, 484.3703.

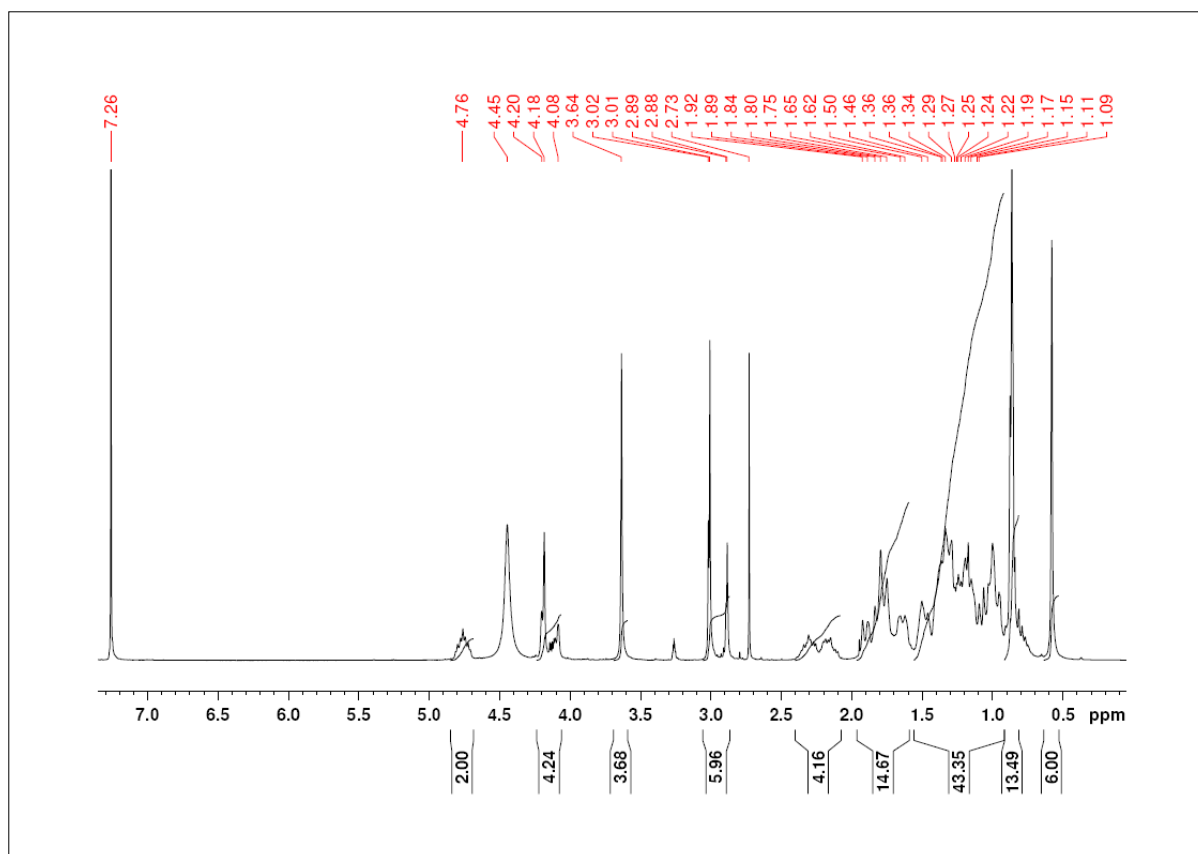


Abbildung 379: ^1H -NMR (500 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOD-}d_4 = 5:1$): (Trifluoroacetat-glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid)-Dimer 88.

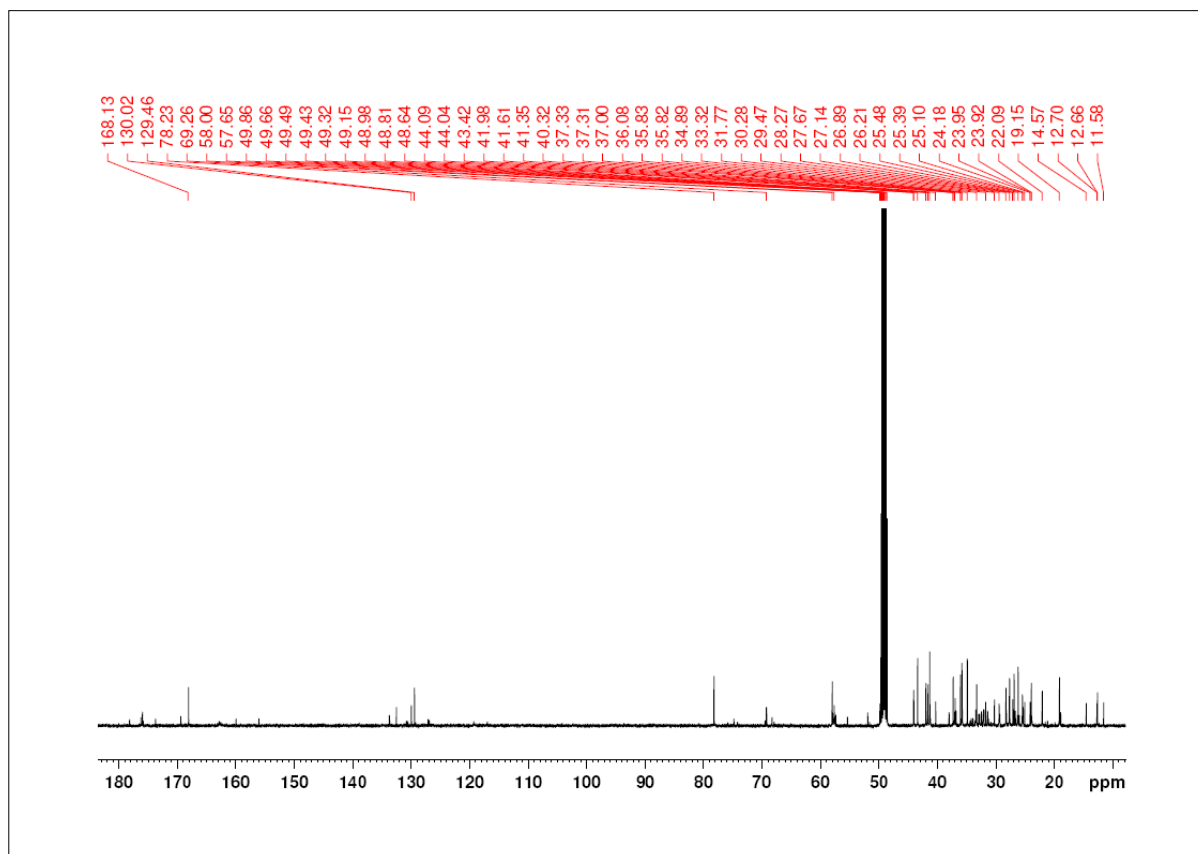
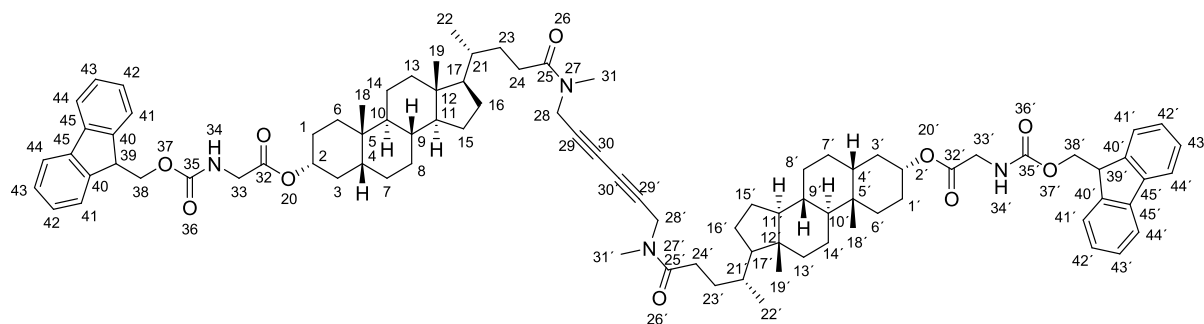


Abbildung 380: ^{13}C -NMR (125.7 MHz, $\text{MeOD-}d_4$): (Trifluoroacetat-glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid)-Dimer 88.

5.3.6.4 (N-Fmoc-glycin-lithocholsäure-N-methylpropargylamid)-Dimer 194**Ansatz:**

Nebenprodukt der Synthese (5.3.1.20).

Durchführung:

Siehe Synthese (5.3.1.20).

Analytik:

Ausbeute: 19 %. **R_F:** 0.50 (*n*-Hexan : Ethylacetat = 1:1). **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ = 0.63 (s, 6H, H-19, H-19'), 0.92-0.94 (m, 12H, H-18, H-18', H-19, H-19'), 0.96-0.99 (m, 2H, H-6, H-6'), 0.92-1.11 (m, 16H, H-7, H-7', H-8, H-8', H-11, H-11', H-13, H-13', H-14, H-14', H-15, H-15', H-16, H-16', H-17, H-17'), 1.28-1.51 (m, 16H, H-1, H-1', H-3, H-3', H-4, H-4', H-8, H-8', H-9, H-9', H-10, H-10', H-14, H-14', H-23, H-23'), 1.63-1.68 (m, 2H, H-15, H-15'), 1.70-1.77 (m, 2H, H-1, H-1'), 1.68-1.99 (m, 10H, H-3, H-3', H-6, H-6', H-7, H-7', H-16, H-16', H-21, H-21'), 1.94-1.97 (m, 2H, H-13, H-13'), 2.20-2.27 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.33-2.40 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.97 (s, 2H, H-31, H-31'), 3.05 (s, 4H, H-31, H-31'), 3.96 (d, $^3J_{HH} = 5.63$ Hz, 4H, H-33), 4.11 (s, 1.1H, H-28, H-28'), 4.24 (t, $^3J_{HH} = 7.50$ Hz, 2H, H-39, H-39'), 4.29 (s, 2.9H, H-28, H-28'), 4.38 (d, $^3J_{HH} = 7.50$ Hz, 2H, H-38, H-38'), 4.79-4.83 (m, 2H, H-2, H-2'), 5.33 (t, $^3J_{HH} = 5.63$ Hz, 2H, H-34, H-34'), 7.31 (dd, $^3J_{HH} = 7.31$ Hz, $^3J_{HH} = 7.4$ Hz, 4H, H-42, H-42'), 7.39 (dd, $^3J_{HH} = 7.4$ Hz, $^3J_{HH} = 7.4$ Hz, 4H, H-43, H-43'), 7.60 (d, $^3J_{HH} = 7.4$ Hz, 4H, H-41, H-41'), 7.77 (d, $^3J_{HH} = 7.4$ Hz, 4H, H-44, H-44'). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, CDCl₃): δ = 12.2 (C19, C19'), 18.6 (C22, C22'), 20.9 (C14, C14'), 23.3 (C18, C18'), 24.2 (C15, C15'), 26.2 (C8, C8'), 26.6 (C7, C7'), 27.0 (C16, C16'), 28.2 (C24, C24'), 30.4 (C1, C1'), 31.0 (C24, C24'), 31.3 (C23, C23'), 32.2 (C23, C23'), 33.4 (C31, C31'), 34.4 (C31, C31'), 34.6 (C5, C5'), 35.0 (C6, C6'), 35.6 (C21, C21'), 35.6 (C9, C9'), 35.8 (C28, C28'), 36.2 (C3, C3'), 39.5 (C28, C28'), 40.2 (C13, C13'), 40.5 (C10, C10'), 41.9 (C4, C4'), 42.7 (C34, C34'), 42.8 (C12, C12'), 56.0 (C40, C40'), 56.2 (C17, C17'), 56.5 (C11, C11'), 67.2 (C39, C39'), 68.7 (C30, C30'), 69.3 (C30, C30'), 69.3 (C29, C29'), 73.4 (C2, C2'), 78.2 (C29, C29'), 120.1 (C44, C44'), 125.1 (C43, C43'), 127.0 (C45, C45'), 127.7 (C42, C42'), 156.3 (C36, C36'), 169.6 (C32, C32'), 173.5 (C25, C25'). **IR** (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3301 (w), 2931 (m), 2844 (m), 2166 (w), 2050 (w), 1981 (w), 1722 (m), 1640 (m), 1514 (m), 1447 (m), 1380 (m), 1334 (m), 1258 (m), 1197 (s), 1105 (m), 1048 (m), 1005 (m), 911 (m), 784 (s), 759 (s), 727 (s). **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für C₉₀H₁₁₄N₄O₁₀Na: m/z 1434.8460, gef.: m/z 1434.8541.

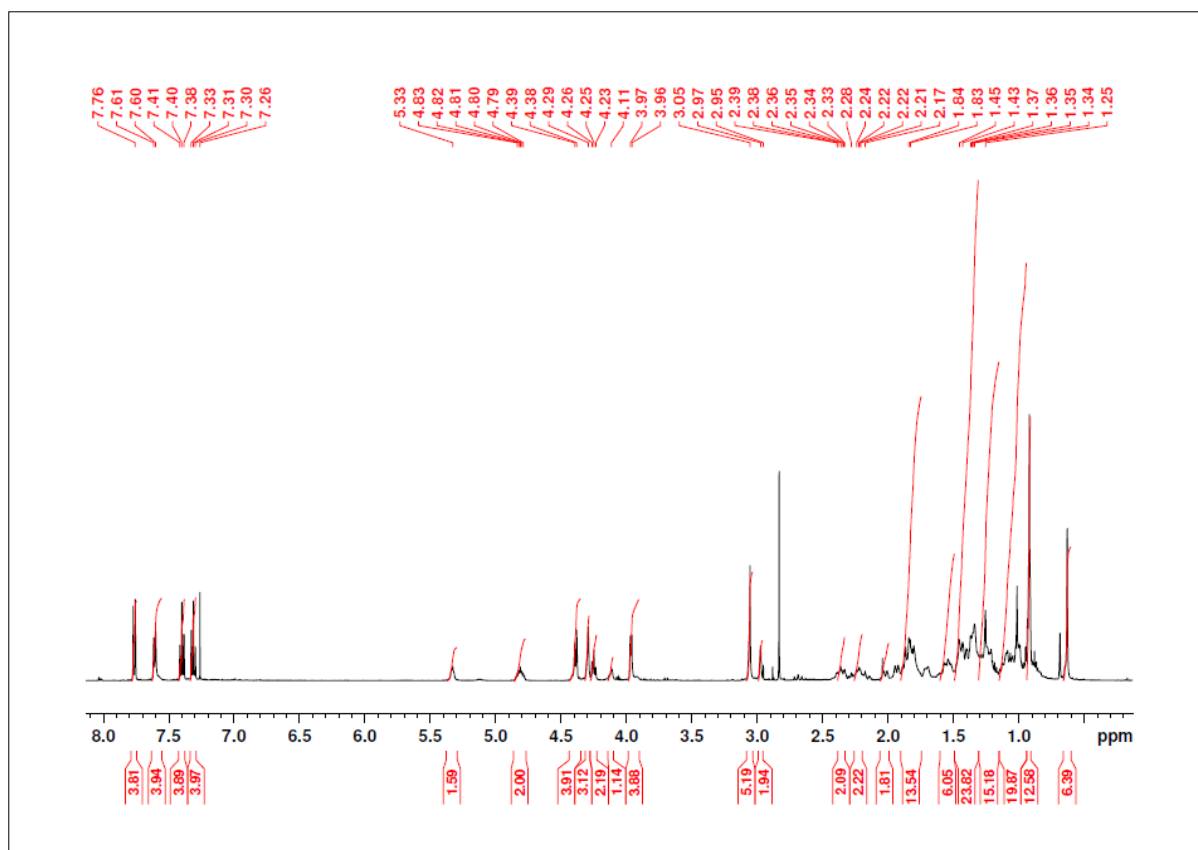


Abbildung 381: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): (N-Fmoc-glycin lithocholsäure-N-methylpropargylamid)-Dimer 194.

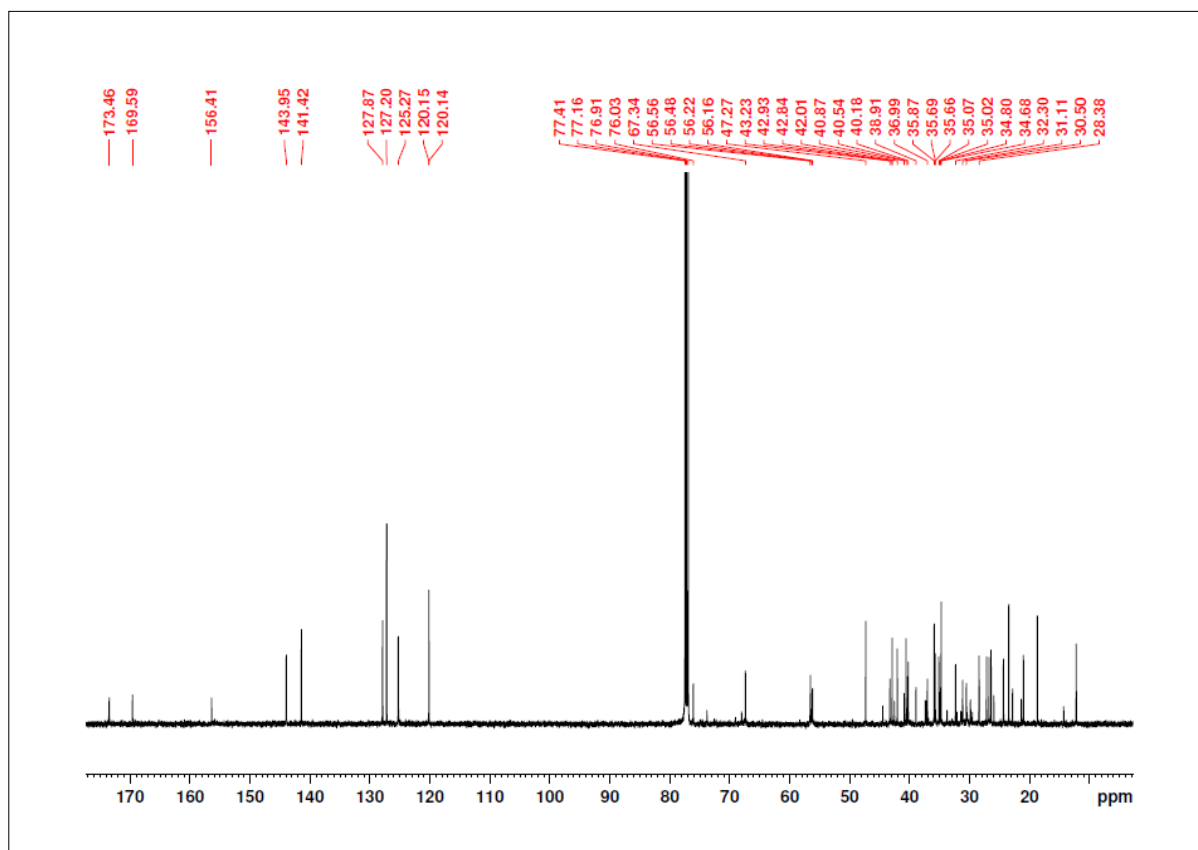
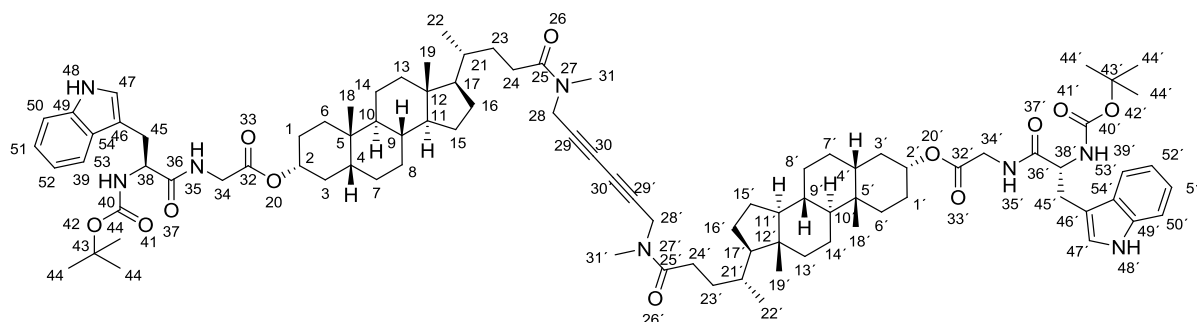


Abbildung 382: ¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃): (N-Fmoc-glycin lithocholsäure-N-methylpropargylamid)-Dimer 194.

5.3.6.5 (*N*-Boc-tryptophan-*N*-glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid)-Dimer 195**Ansatz:**

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
<i>N</i> -Boc-tryptophan-OH	304.34	3.0	0.279	0.085	
88 (5.3.6.3)	1194.70	1.0	0.093	0.110	
HCTU	413.69	3.0	0.279	0.116	
Cl-HOBt	169.57	5.0	0.466	0.079	
DIEA	129.25	60.0	5.587	0.722	0.973
CH ₂ Cl ₂					10.0
DMF					5.0

Durchführung:

0.085 g *N*-Boc-tryptophan-OH (0.279 mmol, 3.0 eq.) wurden in 15 mL eines 2:1-Gemisches aus Dichlormethan und *N,N'*-Dimethylformamid gelöst. Die Lösung wurde im Eisbad auf 0 °C gekühlt und mit 0.116 g HCTU (0.279 mmol, 3.0 eq.) und 0.079 g Cl-HOBt (0.466 mmol, 5.0 eq.) versetzt. Nachdem sich eine klare Lösung gebildet hatte, wurden 0.973 mL DIEA (0.722 g, 5.587 mmol, 60 eq.) zugegeben und das gelbe Gemisch für 10 min bei 0 °C gerührt. Nach Zugabe von 0.110 g (Trifluoracetat-glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid)-Dimer **88** (0.093 mmol, 1.0 eq.) wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmt und für weitere 24 h gerührt. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels DC überprüft. Die Reaktionslösung wurde mit 30 mL Dichlormethan verdünnt. Die organische Phase wurde mit je 60 mL gesättigter NaHCO₃-Lösung, 1 M Salzsäure und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden mit Dichlormethan gegenextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das gelbliche Rohprodukt wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet und anschließend säulenchromatographisch gereinigt (*n*-Hexan : Ethylacetat = 1:2). Es wurden 0.097 g (0.063 mmol) eines feinkristallinen, farblosen Feststoffs isoliert.

Analytik:

Ausbeute: 57 %. **R_F:** 0.24 (*n*-Hexan : Ethylacetat = 1:2). **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ = 0.64 (s, 6H, H-18, H-18'), 0.91 (s, 6H, H-19, H-19'), 0.92 (d, ³J_{HH} = 6.61 Hz, 6H, H-22, H-22'), 0.90-0.99 (m, 2H, H-6, H-6'), 1.01-1.23 (m, 16H, H-7, H-7', H-8, H-8', H-11, H-11', H-13, H-13', H-14, H-14', H-15, H-15', H-16, H-16', H-17, H-17'), 1.25-1.43 (m, 16H, H-1, H-1', H-4, H-4', H-8, H-8', H-9, H-9', H-10, H-10', H-14, H-14', H-23, H-23'), 1.40 (s, 18H, H-44, H-44'), 1.45-1.49 (m, 2H, H-3, H-3'), 1.51-1.55 (m, 2H, H-15, H-15'), 1.60-1.63 (m, 2H, H-1, H-1'), 1.69-1.87 (m, 10H, H-3, H-3', H-6, H-6', H-7, H-7', H-16, H-16', H-21, H-21'), 1.90-1.93 (m, 2H, H-13, H-13'), 2.17-2.28 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.31-2.45 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.97 (s, 2H, H-31, H-31'), 3.06 (s, 4H, H-31, H-31'), 3.17 (d, ³J_{HH} = 4.39 Hz, 4H, H-34, H-34'), 3.86 (dd, ³J_{HH} = 5.90 Hz, ²J_{HH} = 13.04 Hz, 2H, H-45, H-45'), 3.92 (dd, ³J_{HH} = 5.90 Hz, ²J_{HH} = 13.04 Hz, 2H, H-45, H-45'), 4.11 (s, 1.2H, H-28, H-28'), 4.29 (s, 2.8H, H-28, H-28'), 4.44-4.52 (m, 2H, H-38, H-38'), 4.69-4.74 (m, 2H, H-2, H-2'), 5.18 (bs, 2H, H-39, H-39'), 6.39 (t, ³J_{HH} = 4.39 Hz, 2H, H-35, H-35'), 7.10 (t, ³J_{HH} = 7.11 Hz, 2H, H-51, H-51'), 7.18 (t, ³J_{HH} = 7.11 Hz, 2H, H-52, H-52'), 7.34 (d, ³J_{HH} = 7.79 Hz, 2H, H-47, H-47'), 7.62 (d, ³J_{HH} = 7.64 Hz, 2H, H-50, H-50'), 8.41 (d, ³J_{HH} = 7.91 Hz, 2H, H-53, H-53'). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, CDCl₃): δ = 12.1 (C19, C19'), 18.6 (C22, C22'), 21.0 (C14, C14'), 23.4 (C18, C18'), 24.3 (C15, C15'), 26.4 (C8, C8'), 26.6 (C7, C7'), 27.1 (C16, C16'), 28.3 (C44, C44'), 28.4 (C1, C1'), 30.3/30.5 (C23, C23'), 31.1 (C24, C24'), 31.4 (C24, C24'), 32.2 (C23, C23'), 33.6 (C31, C31'), 34.6 (C5, C5'), 34.8 (C31, C31'), 35.1 (C6, C6'), 35.6 (C21, C21'), 35.9 (C9, C9'), 37.0 (C3, C3'), 40.2 (C13, C13'), 40.3 (C28, C28'), 40.5 (C10, C10'), 41.8 (C34, C34'), 42.0 (C4, C4'), 42.9 (C12, C12'), 56.1 (C17, C17'), 56.6 (C11, C11'), 68.7 (C30, C30'), 69.3 (C30, C30'), 69.3 (C29, C29'), 75.9 (C2, C2'), 78.2 (C29, C29'), 80.3 (C43, C43'), 111.36 (C53, C53'), 118.9 (C50, C50'), 119.8 (C51, C51'), 122.3 (C47, C47'), 123.4 (C52, C52'), 124.6 (C52, C52'), 127.7 (C49, C49'), 136.4 (C54, C54'), 155.8 (C40, C40'), 169.0 (C32, C32'), 172.8 (C36, C36'), 173.4 (C25, C25'), 173.6 (C25, C25'). **IR** (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3512 (w), 2924 (m), 2865 (m), 2361 (w), 1710 (m), 1632 (s), 1493 (s), 1456 (s), 1384 (m), 1364 (s), 1245 (m), 1201 (s), 1167 (s), 1096 (m), 1065 (m), 1019 (m), 984 (m), 915 (m), 858 (m), 737 (s), 760 (s). **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für C₉₂H₁₃₀N₈O₁₂Na: m/z 1562.9733, gef.: m/z 1562.9776.

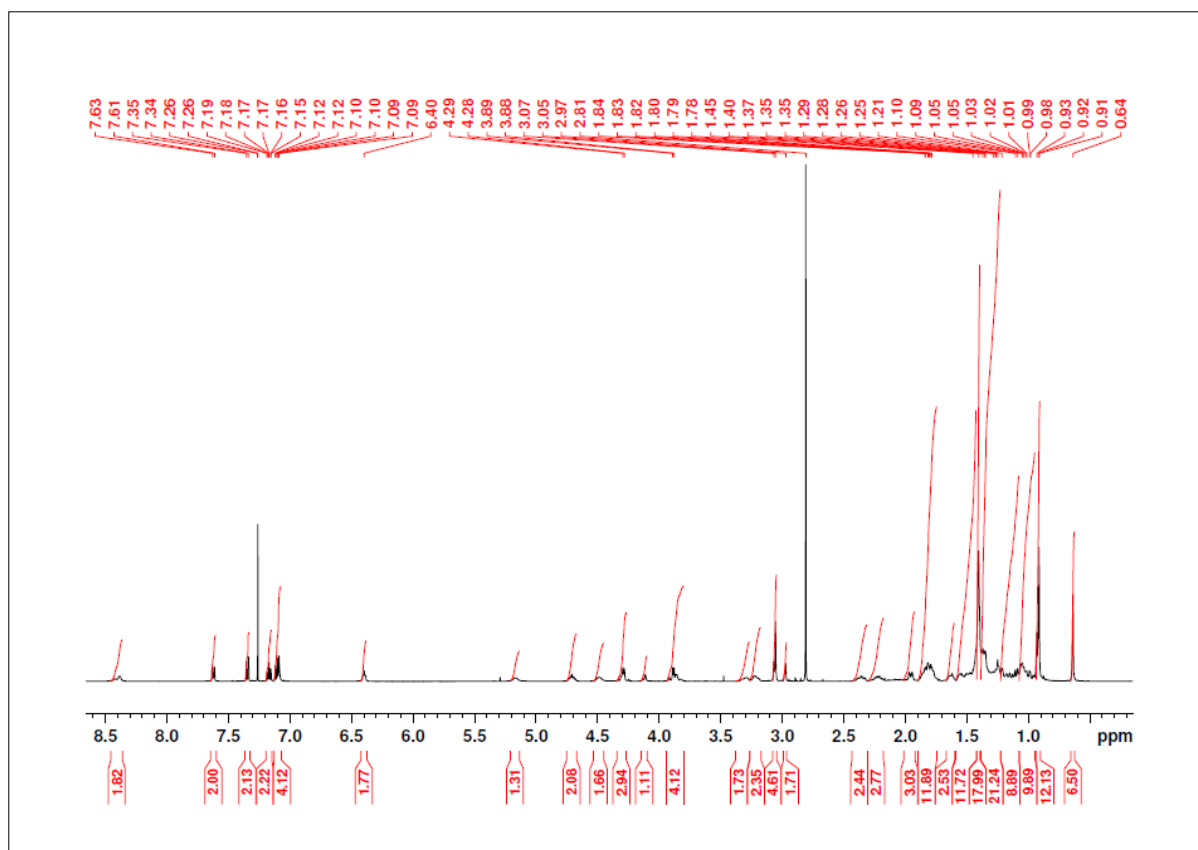


Abbildung 383: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): (N-Boc-tryptophan-N-glycin-lithocholsäure-N-methylpropargylamid)-Dimer 195.

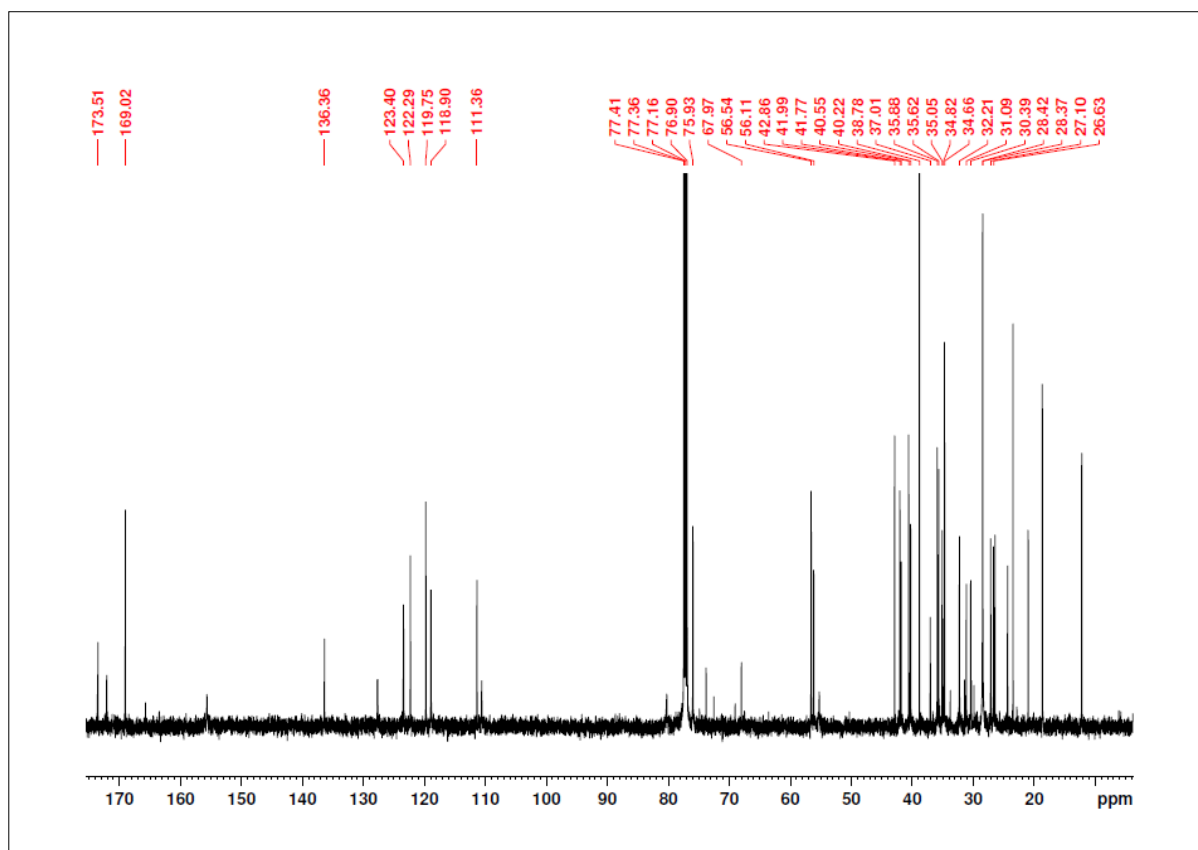
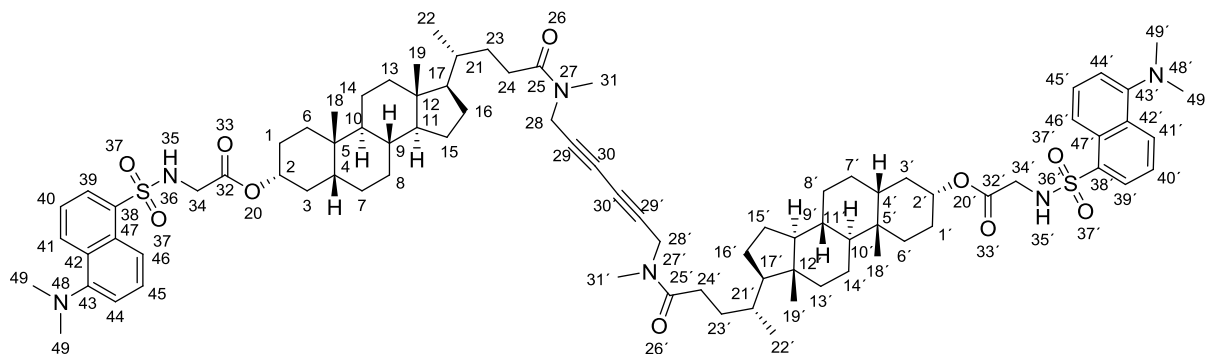


Abbildung 384: ¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃): (N-Boc-tryptophan-N-glycin-lithocholsäure-N-methylpropargylamid)-Dimer 195.

5.3.6.6 (*N*-Dansyl-glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid)-Dimer 196



Ansatz:

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
Dansyl-Chlorid	269.75	7.5	1.270	0.343	
88 (5.3.6.3)	1194.70	1.0	0.169	0.200	
DIEA	129.25	60.0	10.16	1.313	1.769
CH ₂ Cl ₂					10.0

Durchführung:

0.2 g (Trifluoracetat-glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid)-Dimer **88** (0.169 mmol, 1 eq.) wurden in 10 mL Dichlormethan gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu dieser Lösung wurden 0.343 g Dansylchlorid (1.270 mmol, 7.5 eq.) und 1.769 mL DIEA (1.313 g, 10.16 mmol, 60 eq.) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde auf Raumtemperatur erwärmt und weitere 15 h unter Lichtausschluss gerührt. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels DC verfolgt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Gemisch auf 30 mL 1 N Salzsäure gegeben und mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wurde ein weiteres Mal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und die wässrigen Phasen mit Dichlormethan gegenextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel anschließend unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene gelbe, feinkristalline Rohprodukt wurde im Hochvakuum getrocknet und anschließend säulenchromatographisch gereinigt (*n*-Hexan : Ethylacetat = 2:1). Es konnten 0.186 g (0.130 mmol) des gelben Feststoffs isoliert werden.

Analytik:

Ausbeute: 82 %. **R_F:** 0.16 (*n*-Hexan : Ethylacetat = 1:1). **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ = 0.66 (s, 6H, H-19, H-19'), 0.91 (s, 6H, H-18, H-18'), 0.96 (m, 6H, H-22, H-22'), 1.01-1.12 (m, 2H, H-6, H-6'), 1.13-1.25 (m, 16H, H-7, H-7', H-8, H-8', H-11, H-11', H-13, H-13', H-14, H-14', H-15, H-15', H-16, H-16', H-17, H-17'), 1.28-1.52 (m, 16H, H-1, H-1', H-4, H-4', H-8, H-8', H-9, H-9', H-10, H-10', H-14, H-14', H-23, H-23'), 1.53-1.61 (m, 2H, H-3, H-3'), 1.62-1.71 (m, 2H, H-15, H-15'), 1.72-1.75 (m, 2H, H-1, H-1'), 1.76-1.93 (m, 10H, H-3, H-3', H-6, H-6', H-7, H-7', H-16, H-16', H-21, H-21'), 1.94-2.02 (m, 2H, H-13, H-13'), 2.18-2.32 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.32-2.48 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.90 (s, 12H, H-49, H-49'), 3.00 (s, 2H, H-31, H-31'), 3.09 (s, 4H, H-31, H-31'), 3.74 (d, ³J_{HH} = 5.32 Hz, 4H, H-34, H-34'), 4.16 (s, 1.4H, H-28, H-28'), 4.19 (m, 2.6H, H-28, H-28'), 4.54-4.67 (m, 2H, H-2, H-2'), 5.31 (s, 2H, H-35, H-35'), 7.21 (d, ³J_{HH} = 7.92 Hz, 2H, H-44, H-44'), 7.54 (t, ³J_{HH} = 7.92 Hz, 2H, H-45, H-45'), 7.61 (t, ³J_{HH} = 7.92 Hz, 2H, H-40, H-40'), 8.30 (dd, ³J_{HH} = 7.21 Hz, ⁵J_{HH} = 1.34 Hz, 2H, H-41, H-41'), 8.35 (d, ³J_{HH} = 8.67 Hz, 2H, H-46, H-46'), 8.57 (d, ³J_{HH} = 8.56 Hz, 2H, H-39, H-39'). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, CDCl₃): δ = 12.1 (C19, C19'), 18.6 (C22, C22'), 20.9 (C14, C14'), 23.3 (C18, C18'), 24.3 (C15, C15'), 26.4 (C8, C8'), 26.4 (C7, C7'), 27.0 (C16, C16'), 28.3 (C1, C1'), 30.3/30.5 (C23, C23'), 31.0 (C24, C24'), 31.4 (C24, C24'), 32.0 (C23, C23'), 33.6 (C31, C31'), 34.6 (C5, C5'), 34.8 (C31, C31'), 34.9 (C6, C6'), 35.6 (C21, C21'), 35.8 (C9, C9'), 36.9 (C3, C3'), 40.2 (C13, C13'), 40.3 (C28, C28'), 40.5 (C10, C10'), 41.9 (C34, C34'), 42.8 (C4, C4'), 44.7 (C12, C12'), 45.5 (C49, C49'), 56.2 (C17, C17'), 56.5 (C11, C11'), 68.7 (C30, C30'), 69.3 (C30, C30'), 69.3 (C29, C29'), 76.4 (C2, C2'), 78.2 (C29, C29'), 115.4 (C44, C44'), 119.0 (C40, C40'), 123.2 (C45, C45'), 128.6 (C40, C40'), 129.8 (C41, C41'), 129.9 (C42, C42'), 129.9 (C47, C47'), 130.9 (C46, C46'), 134.2 (C38, C38'), 151.9 (C43, C43'), 168.2 (C32, C32'), 173.4 (C25, C25'), 173.5 (C25, C25'). **IR** (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3271 (w), 2925 (s), 2867 (m), 2785 (w), 1732 (m), 1641 (s), 1575 (m), 1448 (s), 1394 (m), 1201 (s), 1142 (s), 1120 (s), 1064 (m), 1002 (m), 983 (m), 946 (m), 911 (m), 846 (m), 788 (s), 731 (s), 682 (m). **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für C₈₄H₁₁₇N₆O₁₀S₂: m/z 1433.8267, gef.: m/z 1433.8302; ber. für C₈₄H₁₁₆N₆O₁₀S₂Na: m/z 1455.8087, gef.: m/z 1455.8150.

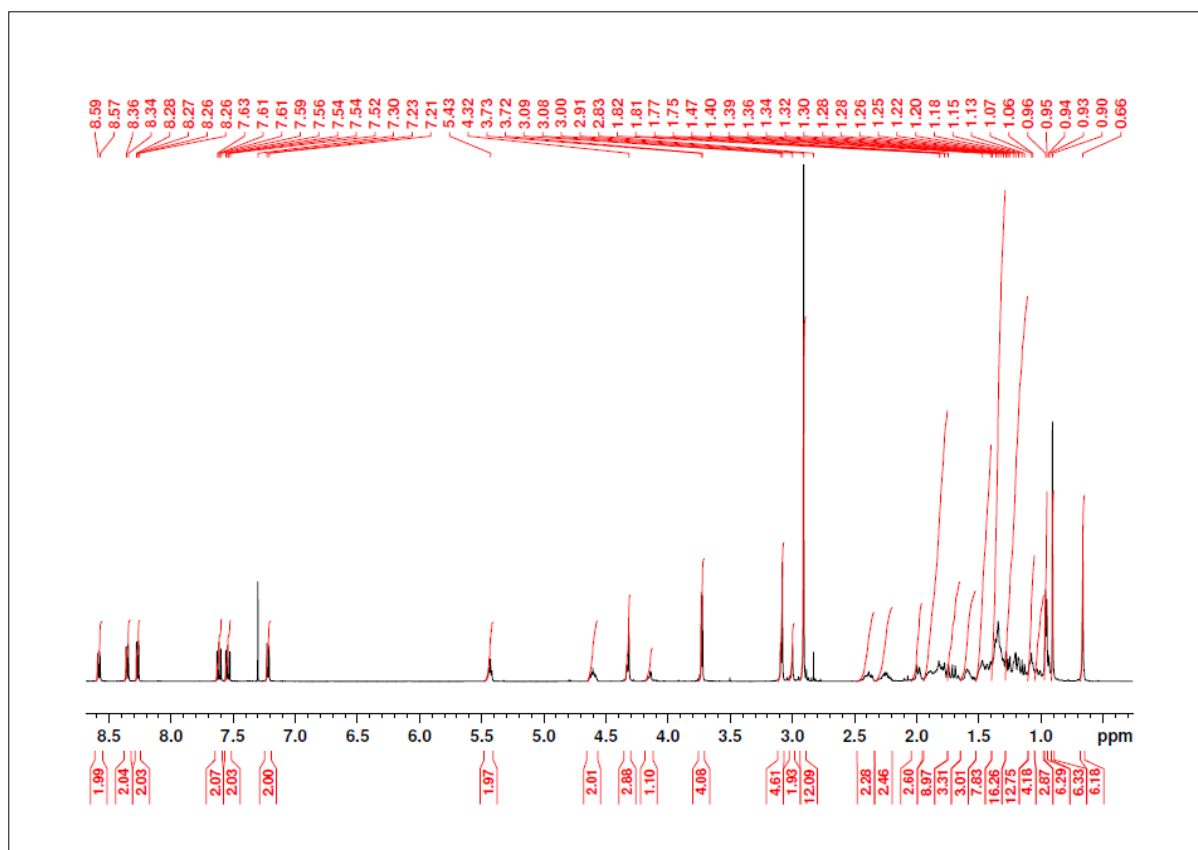


Abbildung 385: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): (N-Dansyl- glycin-lithocholsäure-N-methylpropargylamid)-Dimer 196.

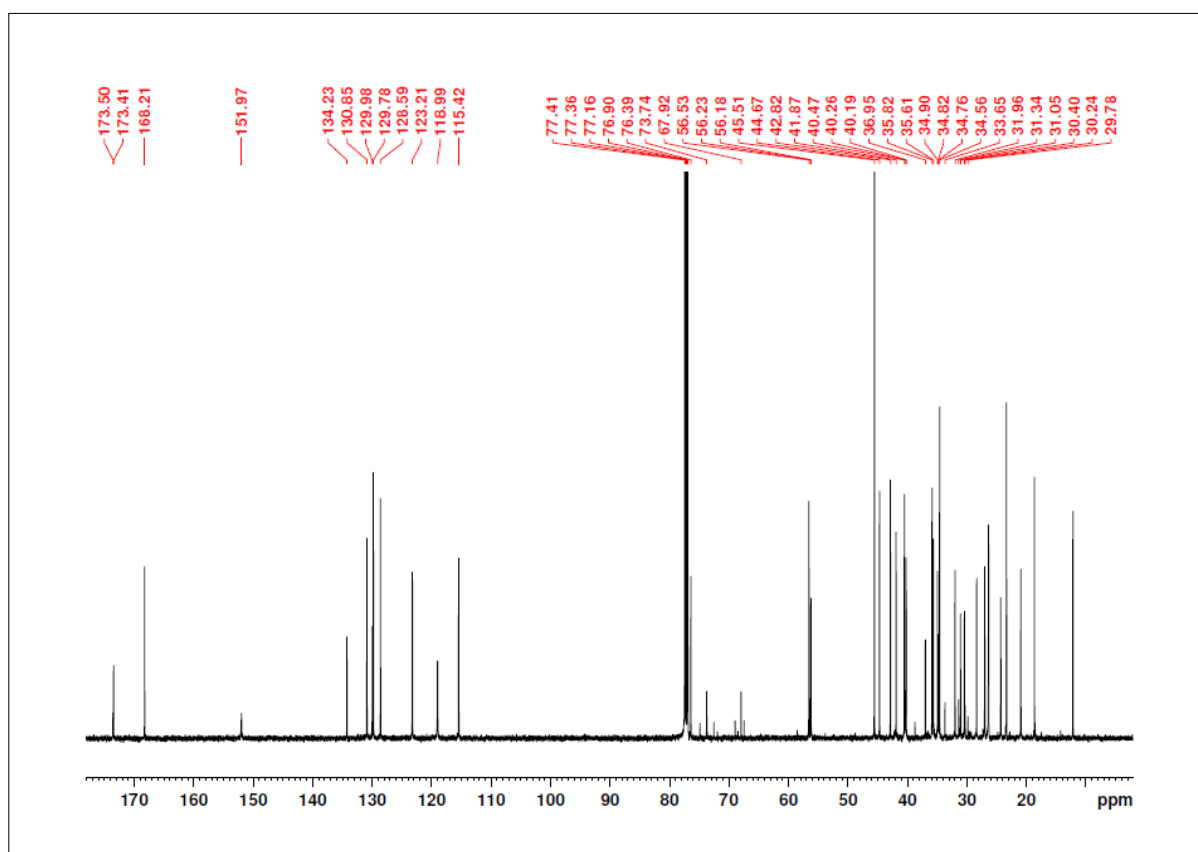
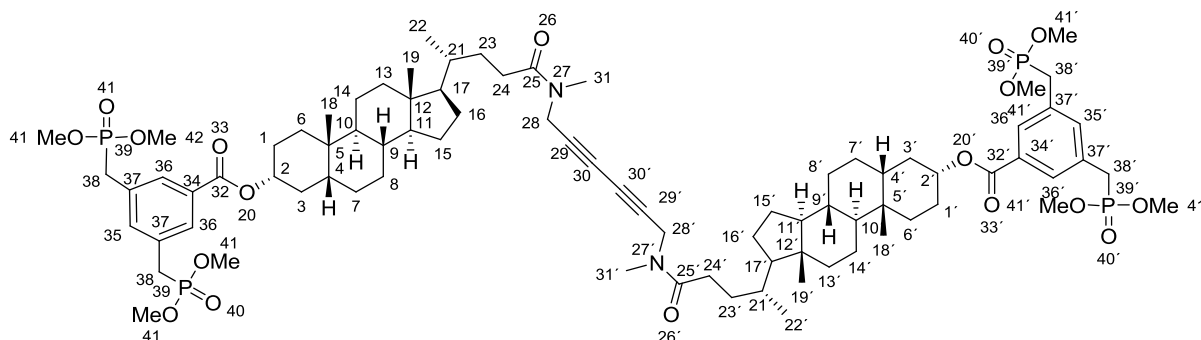


Abbildung 386: ¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃): (N-Dansyl-glycin-lithocholsäure-N-methylpropargylamid)-Dimer 196.

5.3.6.7 (BP-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid)-Dimer **89**Ansatz:

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
75 (5.3.1.5)	762.85	1.0	0.131	0.1	
CuCl	99.00	10.0	1.311	0.128	
TMEDA	116.20	10.0	1.311	0.152	0.198
CH ₂ Cl ₂					10.0

Durchführung:

a) 0.1 g BP-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid **75** (0.131 mmol, 1 eq.) wurden in 10 mL Dichlormethan gelöst. Zu dieser Lösung wurde 0.128 g Kupfer(I)chlorid (1.311 mmol, 10 eq.) und 0.198 mL *N,N,N',N'*-Tetramethylethylendiamin (0.152 g, 1.311 mmol, 10 eq.) zugegeben. Es wurde solange bei Raumtemperatur gerührt, bis das Kupfer(I)chlorid vollständig in Lösung gegangen war. Hierbei färbte sich die Lösung hellgrün. Danach wurde die Atmosphäre über der Reaktionslösung mit Sauerstoff gesättigt. Die tiefblaue Lösung wurde weitere 5 h bei Raumtemperatur gerührt und der Reaktionsverlauf mittels DC überprüft. Nach vollständiger Umsetzung der Edukte wurde das Reaktionsgemisch auf 50 mL gesättigte Ammoniumchlorid-Lösung gegossen, die organische Phase abgetrennt und zwei weitere Male mit gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden mit Dichlormethan gegenextrahiert und die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet. Das Trocknungsmittel wurde abgetrennt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Dichlormethan : Methanol = 19:1). Es konnten 0.098 g (0.063 mmol) des Dimers **89** in Form eines farblosen, feinkristallinen Feststoffs isoliert werden.

b) Es konnten 0.030 g (0.190 mmol) (BP-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid)-Dimer **89** als Nebenprodukt der Glaser-Kupplung (Synthese 5.3.1.8) isoliert werden.

Analytik:

Ausbeute: 97 %. **R_F:** 0.22 (Dichlormethan : Methanol = 19:1). **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ = 0.65 (s, 6H, H-19, H-19'), 0.93 (d, $^3J_{HH}$ = 6.67 Hz, 6H, H-22, H-22'), 0.94 (s, 6H, H-18, H-18'), 0.95-1.03 (m, 2H, H-6, H-6'), 1.05-1.26 (m, 16H, H-7, H-7', H-8, H-8', H-11, H-11', H-13, H-13', H-14, H-14', H-15, H-15', H-16, H-16', H-17, H-17'), 1.28-1.47 (m, 16H, H-1, H-1', H-4, H-4', H-8, H-8', H-9, H-9', H-10, H-10', H-14, H-14', H-23, H-23'), 1.49-1.52 (m, 2H, H-3, H-3'), 1.53-1.59 (m, 2H, H-15, H-15'), 1.65-1.68 (m, 2H, H-1, H-1'), 1.71-1.93 (m, 10H, H-3, H-3', H-6, H-6', H-7, H-7', H-16, H-16', H-21, H-21'), 1.95-1.98 (m, 2H, H-13, H-13'), 2.19-2.25 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.28-2.44 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.95 (s, 2H, H-31, H-31'), 3.05 (s, 4H, H-31, H-31'), 3.20 (d, $^2J_{PH}$ = 21.8 Hz, 8H, H-38, H-38'), 3.67 (d, $^2J_{PH}$ = 10.8 Hz, 24H, H-41, H-41'), 4.10 (d, $^2J_{HH}$ = 7.97 Hz, 1.4H, H-28, H-28'), 4.28 (d, $^2J_{HH}$ = 7.97 Hz, 2.6H, H-28, H-28'), 4.91-4.94 (m, 2H, H-2, H-2'), 7.44 (bs, 2H, H-35, H-35'), 7.83 (d, $^4J_{HH}$ = 2.0 Hz, 4H, H-36, H-36'). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, CDCl₃): δ = 12.2 (C19, C19'), 18.7 (C22, C22'), 21.0 (C14, C14'), 23.5 (C18, C18'), 24.3 (C15, C15'), 26.4 (C8, C8'), 27.2 (C7, C7'), 28.4 (C16, C16'), 30.2 (C24, C24'), 30.4 (C1, C1'), 31.1 (C23, C23'), 32.4 (C23, C23'), 33.2 (C31, C31'), 33.3 (d, $^1J_{PC}$ = 115.3 Hz, C38, C38'), 34.5 (C6, C6'), 34.8 (C31, C31'), 35.2 (C21, C21'), 35.6 (C5, C5'), 35.9 (C9, C9'), 36.3 (C28, C28'), 38.4 (C3, C3'), 39.3 (C28, C28'), 39.9 (C13, C13'), 40.3 (C10, C10'), 41.8 (C4, C4'), 42.9 (C12, C12'), 53.1 (d, $^2J_{PC}$ = 6.1 Hz, C42, C42'), 56.1 (C17, C17'), 56.6 (C11, C11'), 67.6 (C30, C30'), 67.8 (C30, C30'), 73.4 (C2, C2'), 73.6 (C29, C29'), 75.6 (C29, C29'), 129.6 (C36, C36'), 131.8 (C34, C34'), 132.1 (C37, C37'), 135.2 (C35, C35'), 165.6 (C32, C32'), 173.4 (C25, C25'). **³¹P-NMR** (121.5 MHz, CDCl₃): δ = 28.1. **IR** (ATR): $\tilde{\nu}$ = 2929 (m), 2864 (m), 2036 (w), 1980 (w), 1712 (m), 1650 (m), 1450 (m), 1392 (w), 1324 (w), 1250 (s), 1206 (s), 1164 (s), 1114 (w), 1054 (s), 1026 (s), 986 (m), 902 (m), 852 (m), 805 (m), 771 (w), 726 (w), 693 (w). **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für C₈₂H₁₂₄N₂O₁₈P₄Na: m/z 1571.7692, gef.: m/z 1571.7814.

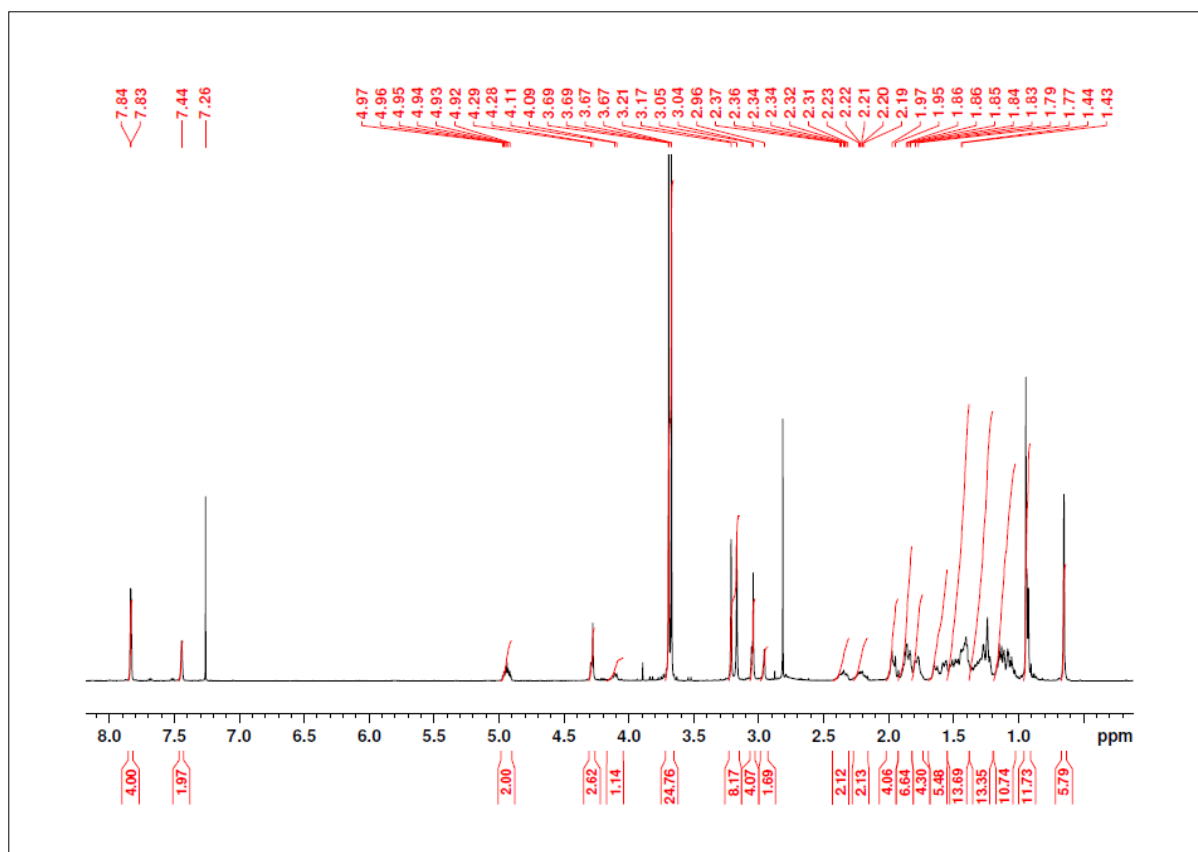


Abbildung 387: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): (BP-lithocholsäure-N-methylpropargylamid)-Dimer 89.

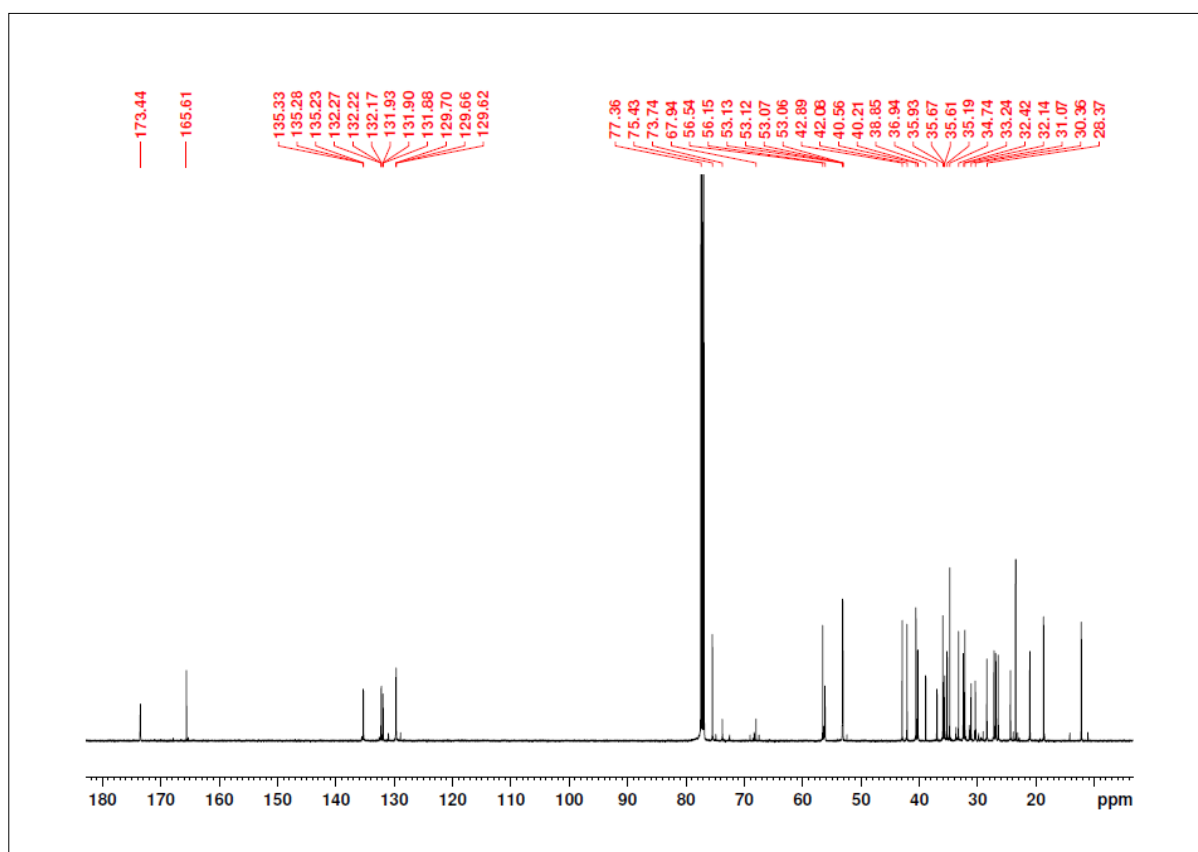
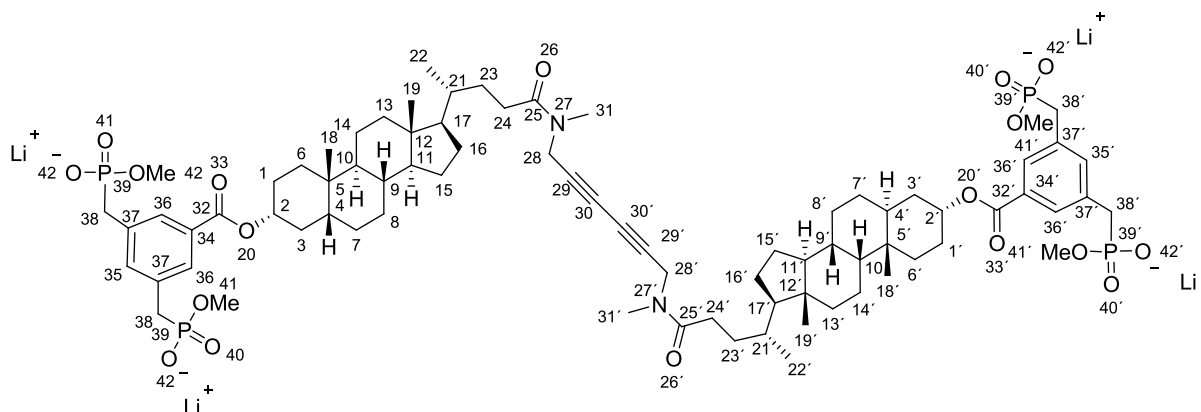


Abbildung 388: ¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃): (BP-lithocholsäure-N-methylpropargylamid)-Dimer 89.

5.3.6.8 (BP(OLi)₂-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid)-Dimer 90Ansatz:

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
89 (5.3.6.7)	1549.76	1.0	0.023	0.036	
LiBr	86.84	4.4	0.102	0.009	
CH ₃ CN					10.0

Durchführung:

0.036 g (BP-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid)-Dimer **89** (0.023 mmol, 1 eq.) wurden in 10 mL Acetonitril gelöst und mit 0.009 g wasserfreiem LiBr (0.102 mmol, 4.4 eq.) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 48 h unter Rückfluss erhitzt. Dabei fiel das Produkt als farbloser Feststoff aus. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels DC überprüft. Nach vollständiger Umsetzung des Edukts wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur gekühlt und der Feststoff samt Reaktionslösung in ein Zentrifugenglas überführt. Der erhaltene Feststoff wurde abgetrennt und vier Mal mit je 10 mL Acetonitril gewaschen. Das farblose Produkt (0.034 g, 0.022 mmol) wurde gründlich im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Analytik:

Ausbeute: 98 %. **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄ = 1:1): δ = 0.39 (s, 6H, H-19, H-19'), 0.67 (d, $^3J_{HH}$ = 6.67 Hz, 6H, H-22, H-22'), 0.68 (s, 6H, H-18, H-18'), 0.80-1.88 (m, 2H, H-6, H-6'), 0.90-1.11 (m, 16H, H-7, H-7', H-8, H-8', H-11, H-11', H-13, H-13', H-14, H-14', H-15, H-15', H-16, H-16', H-17, H-17'), 1.13-1.32 (m, 16H, H-1, H-1', H-4, H-4', H-8, H-8', H-9, H-9', H-10, H-10', H-14, H-14', H-23, H-23'), 1.34-1.37 (m, 2H, H-3, H-3'), 1.38-1.44 (m, 2H, H-15, H-15'), 1.50-1.53 (m, 2H, H-1, H-1'), 1.56-1.72 (m, 10H, H-3, H-3', H-6, H-6', H-7, H-7', H-16, H-16', H-21, H-21'), 1.80-1.83 (m, 2H, H-13, H-13'), 1.92-2.01 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.07-2.19 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.68 (s, 2H, H-31, H-31'), 2.71 (d, $^2J_{PH}$ = 20.6 Hz, 8H, H-38, H-38'), 2.83 (s, 4H, H-31, H-31'), 3.25 (d, $^2J_{PH}$ = 10.8 Hz, 12H, H-41, H-41'), 3.91 (d, $^2J_{HH}$ = 7.97 Hz, 1.4H, H-28, H-28'), 3.99 (d, $^2J_{HH}$ = 7.97 Hz, 2.6H, H-28, H-28'), 4.60-4.64 (m, 2H, H-2, H-2'), 7.29 (bs, 2H, H-35, H-35'), 7.45 (bs, 4H, H-36, H-36'). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄ = 1:1): δ = 12.4 (C19, C19'), 18.8 (C22, C22'), 21.4 (C14, C14'), 23.7 (C18, C18'), 24.7 (C15, C15'), 26.9 (C8, C8'), 27.2 (C7, C7'), 28.7 (C16, C16'), 30.8 (C24, C24'), 31.6 (C1, C1'), 31.9 (C23, C23'), 32.9 (C23, C23'), 34.0 (C31, C31'), 35.0 (d, $^1J_{PC}$ = 115.3 Hz, C38, C38'), 35.2 (C6, C6'), 35.3 (C31, C31'), 35.4 (C21, C21'), 35.6 (C5, C5'), 36.0 (C9, C9'), 36.4 (C28, C28'), 37.5 (C3, C3'), 40.7 (C28, C28'), 40.8 (C13, C13'), 41.0 (C10, C10'), 42.6 (C4, C4'), 43.3 (C12, C12'), 51.8 (d, $^2J_{PC}$ = 6.1 Hz, C42, C42'), 56.5 (C17, C17'), 57.0 (C11, C11'), 68.2 (C30, C30'), 68.7 (C30, C30'), 73.8 (C2, C2'), 75.7 (C29, C29'), 78.2 (C29, C29'), 128.6 (C36, C36'), 130.8 (C34, C34'), 132.1 (C37, C37'), 136.3 (C35, C35'), 167.5 (C32, C32'), 174.9 (C25, C25'), 175.2 (C25, C25'). **³¹P-NMR** (121.5 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄ = 1:1): δ = 22.01. **IR** (ATR): $\tilde{\nu}$ = 2929 (w), 2866 (w), 2358 (w), 2340 (w), 2162 (w), 1980 (w), 1728 (m), 1631 (m), 1530 (w), 1445 (m), 1403 (w), 1382 (m), 1335 (m), 1244 (m), 1202 (s), 1095 (m), 1037 (m), 978 (m), 862 (s), 760 (w), 711 (m). **HRMS** (ESI neg., MeOH): ber. für C₇₈H₁₁₃N₂O₁₈P₄: m/z 496.5652, gef.: m/z 496.5745.

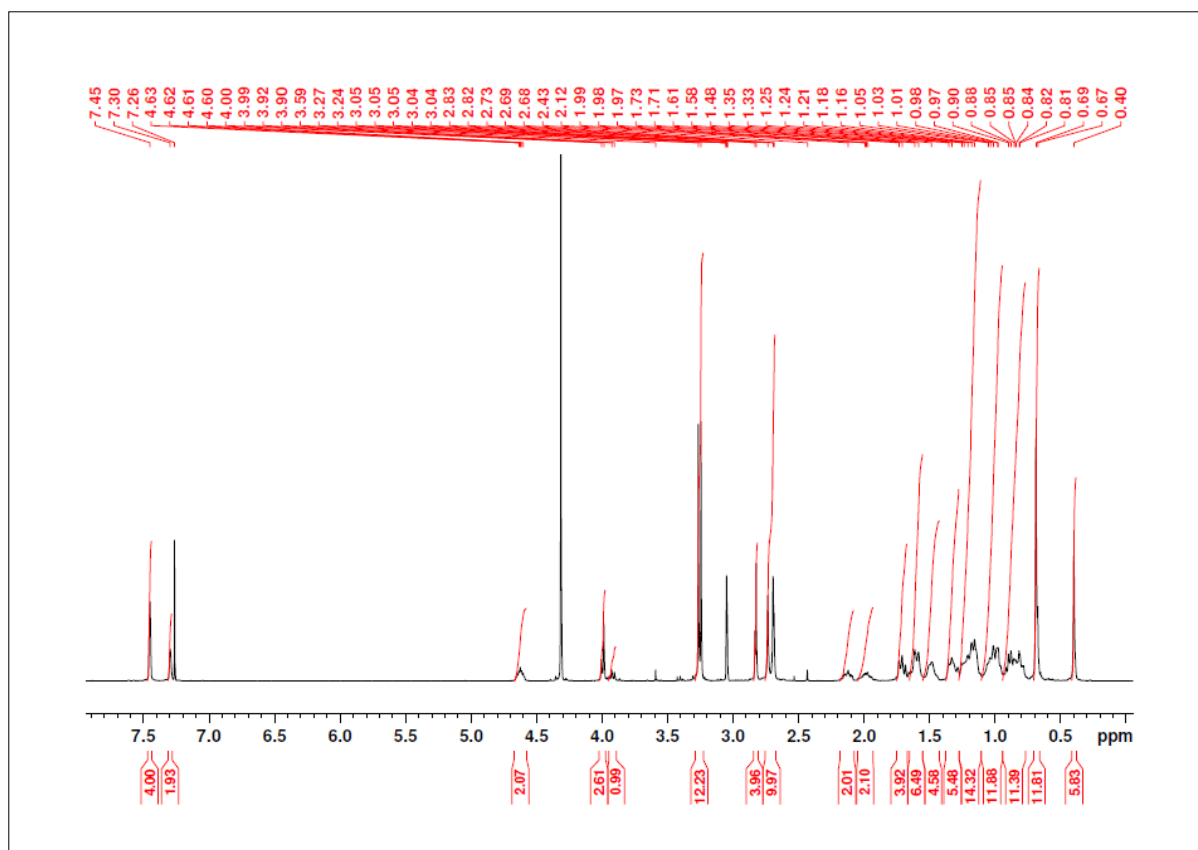


Abbildung 389: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄ = 1:1): (BP(OLi)₂-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid)-Dimer 90.

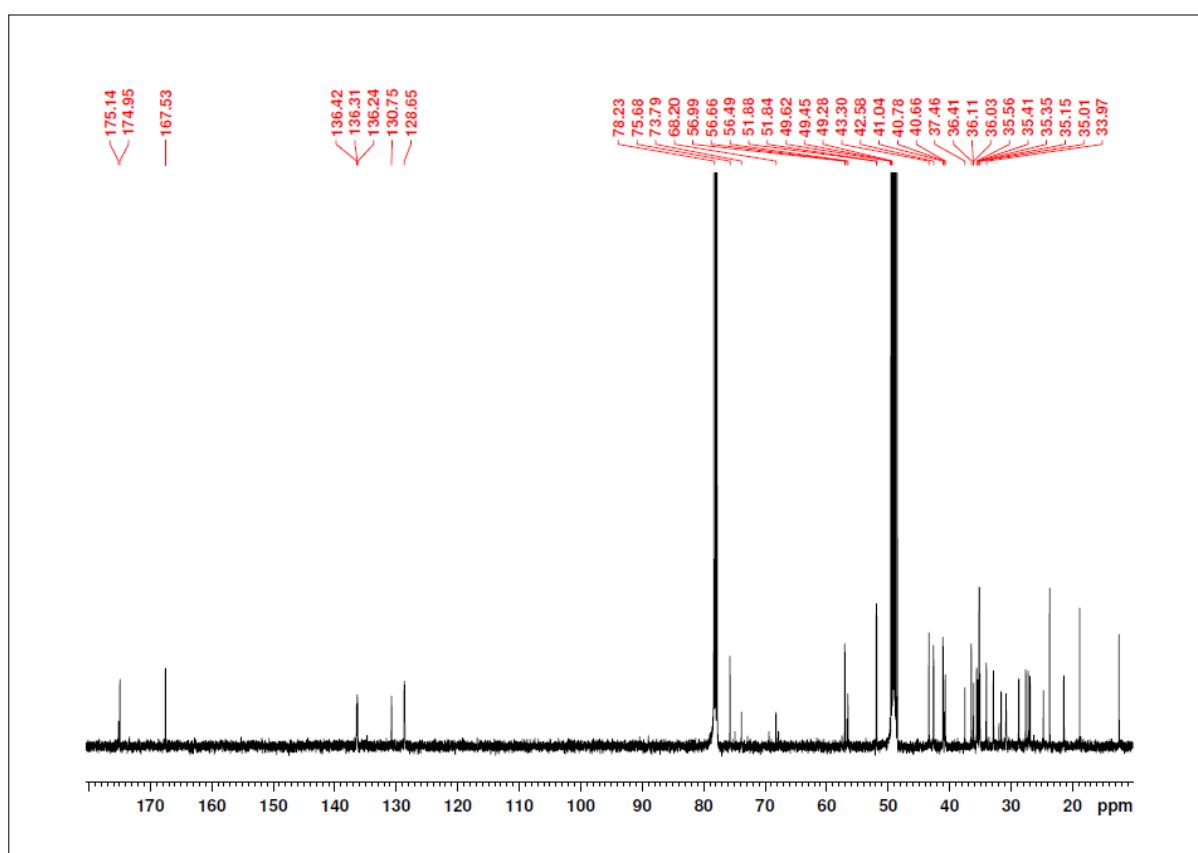
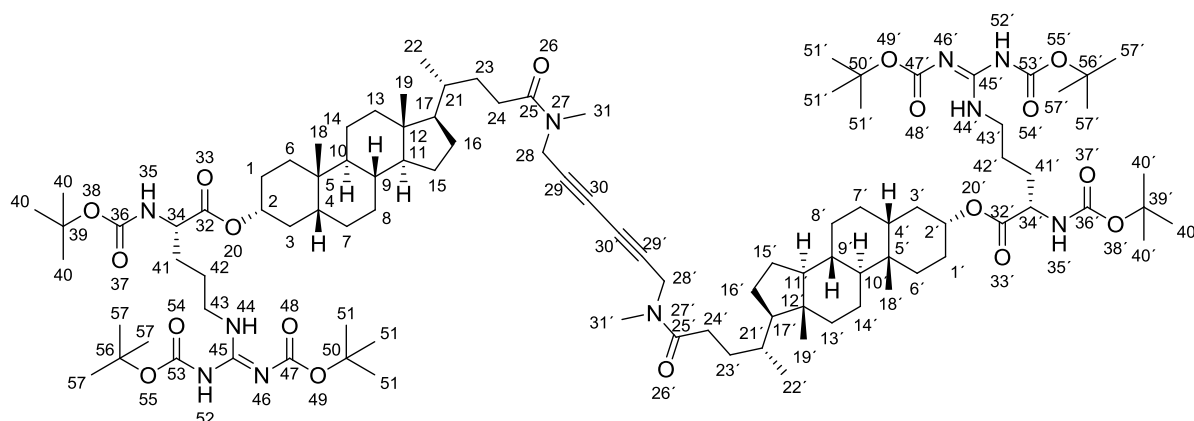


Abbildung 390: ¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄ = 1:1): (BP(OLi)₂-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid)-Dimer 90.

5.3.6.9 (*N*-Boc-arginin(Boc)₂-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid)-Dimer **96****Ansatz:**

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
95 (5.3.6.1)	853.31	1.0	0.275	0.235	
<i>N</i> -Boc-arginin(Boc) ₂ -OH	474.55	3.0	0.826	0.392	
HCTU	413.69	2.4	0.661	0.273	
Cl-HOBt	169.57	5.0	1.377	0.234	
DIEA	129.25	12.0	3.305	0.427	0.576
CH ₂ Cl ₂					15.0
DMF					5.0

Durchführung:

0.392 g *N*-Boc-arginin(Boc)₂-OH (0.826 mmol, 3.0 eq.) wurden in 20 mL eines 3:1-Gemischs aus Dichlormethan und *N,N'*-Dimethylformamid gelöst. Die Lösung wurde im Eisbad auf 0 °C gekühlt und mit 0.273 g HCTU (0.661 mmol, 2.4 eq.) und 0.234 g Cl-HOBt (1.377 mmol, 5.0 eq.) versetzt. Nachdem sich eine klare Lösung gebildet hatte, wurden 0.576 mL DIEA (0.427 g, 3.305 mmol, 12 eq.) zugegeben und das gelbe Gemisch für 10 min bei 0 °C gerührt. Nach Zugabe von 0.235 g (Lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid)-Dimer **95** (0.275 mmol, 1.0 eq.) wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmt und für weitere 24 h gerührt. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels DC überprüft. Die Reaktionslösung wurde mit 30 mL Dichlormethan verdünnt. Die organische Phase wurde mit je 60 mL gesättigter NaHCO₃-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden mit Dichlormethan gegenextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das gelbliche Rohprodukt wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet und anschließend säulenchromato-

graphisch gereinigt (*n*-Hexan : Ethylacetat = 1:1). Es wurden 0.403 g (0.228 mmol) eines feinkristallinen, farblosen Feststoffs isoliert.

Analytik:

Ausbeute: 83 %. **R_F:** 0.36 (*n*-Hexan : Ethylacetat = 1:1). **¹H-NMR** (300 MHz, MeOD-*d*₄): δ = 0.70 (s, 6H, H-19, H-19'), 0.96 (d, $^3J_{HH}$ = 6.86 Hz, 6H, H-22, H-22'), 0.99 (s, 6H, H-18, H-18'), 1.04-1.11 (m, 2H, H-6, H-6'), 1.19-1.35 (m, 16H, H-7, H-7', H-8, H-8', H-11, H-11', H-13, H-13', H-14, H-14', H-15, H-15', H-16, H-16', H-17, H-17'), 1.37-1.51 (m, 16H, H-1, H-1', H-4, H-4', H-8, H-8', H-9, H-9', H-10, H-10', H-14, H-14', H-23, H-23'), 1.45 (s, 18H, H-56, H-56'), 1.49 (s, 18H, H-40, H-40'), 1.56-1.60 (m, 2H, H-3, H-3'), 1.55 (s, 18H, H-51, H-51'), 1.63-1.67 (m, 2H, H-15, H-15'), 1.71-1.75 (m, 4H, H-41, H-41'), 1.75-1.77 (m, 2H, H-1, H-1'), 1.79-1.87 (m, 10H, H-3, H-3', H-6, H-6', H-7, H-7', H-16, H-16', H-21, H-21'), 1.88-1.90 (m, 4H, H-42, H-42'), 1.11-1.18 (m, 2H, H-13, H-13'), 2.25-2.37 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.38-2.52 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.95 (s, 2.5H, H-31, H-31'), 3.11 (s, 3.5H, H-31, H-31'), 3.83-3.93 (m, 2H, H-43, H-43'), 4.06 (s, 1H, H-28, H-28'), 4.27-4.30 (m, 3H, H-28, H-28'), 4.47-4.52 (m, 1H, H-34, H-34'), 4.66-4.78 (m, 2H, H-2, H-2'). **¹³C-NMR** (75.4 MHz, MeOD-*d*₄): δ = 12.7 (C19, C19'), 19.2 (C22, C22'), 20.9 (C14, C14'), 22.1 (C18, C18'), 24.0 (C15, C15'), 24.2 (C42, C42'), 25.5 (C41, C41'), 26.5 (C8, C8'), 27.8 (C7, C7'), 27.9 (C40, C40'), 28.4 (C16, C16'), 28.5 (C51, C51'), 28.9 (C57, C57'), 29.0 (C24, C24'), 29.5 (C1, C1'), 29.9 (C24, C24'), 31.4 (C24, C24'), 32.5 (C23, C23'), 35.8 (C23, C23'), 35.9 (C31, C31'), 36.2 (C31, C31'), 36.6 (C6, C6'), 37.0 (C21, C21'), 37.3 (C5, C5'), 37.4 (C9, C9'), 38.0 (C28, C28'), 38.2 (C3, C3'), 39.0 (C28, C28'), 40.9 (C4, C4'), 41.3 (C13, C13'), 42.0 (C28, C28'), 44.1 (C43, C43'), 45.6 (C12, C12'), 55.3 (C17, C17'), 55.5 (C11, C11'), 57.6 (C34, C34'), 68.4 (C30, C30'), 74.3 (C30, C30'), 76.6 (C2, C2'), 80.0 (C29, C29'), 80.1 (C39, C39'), 80.6 (C50, C50'), 85.3 (C56, C56'), 155.1 (C53, C53'), 156.2 (C36, C36'), 158.1 (C47, C47'), 162.8 (C45, C45'), 173.9 (C32, C32'), 175.9 (C25, C25'), 176.2 (C25, C25'). **IR** (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3376 (w), 2931 (w), 2864 (w), 2363 (w), 1706 (m), 1645 (m), 1609 (m), 1505 (m), 1455 (m), 1392 (m), 1362 (m), 1271 (s), 1248 (s), 1147 (s), 1093 (s), 1051 (m), 984 (m), 918 (w), 893 (w), 854 (w), 812 (w), 777 (w), 731 (w). **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für C₉₈H₁₆₀N₁₀O₁₈Na: *m/z* 1789.1836, gef.: *m/z* 1789.2149; ber. für C₉₈H₁₆₁N₁₀O₁₈: *m/z* 1767.2017, gef.: *m/z* 1767.2334.

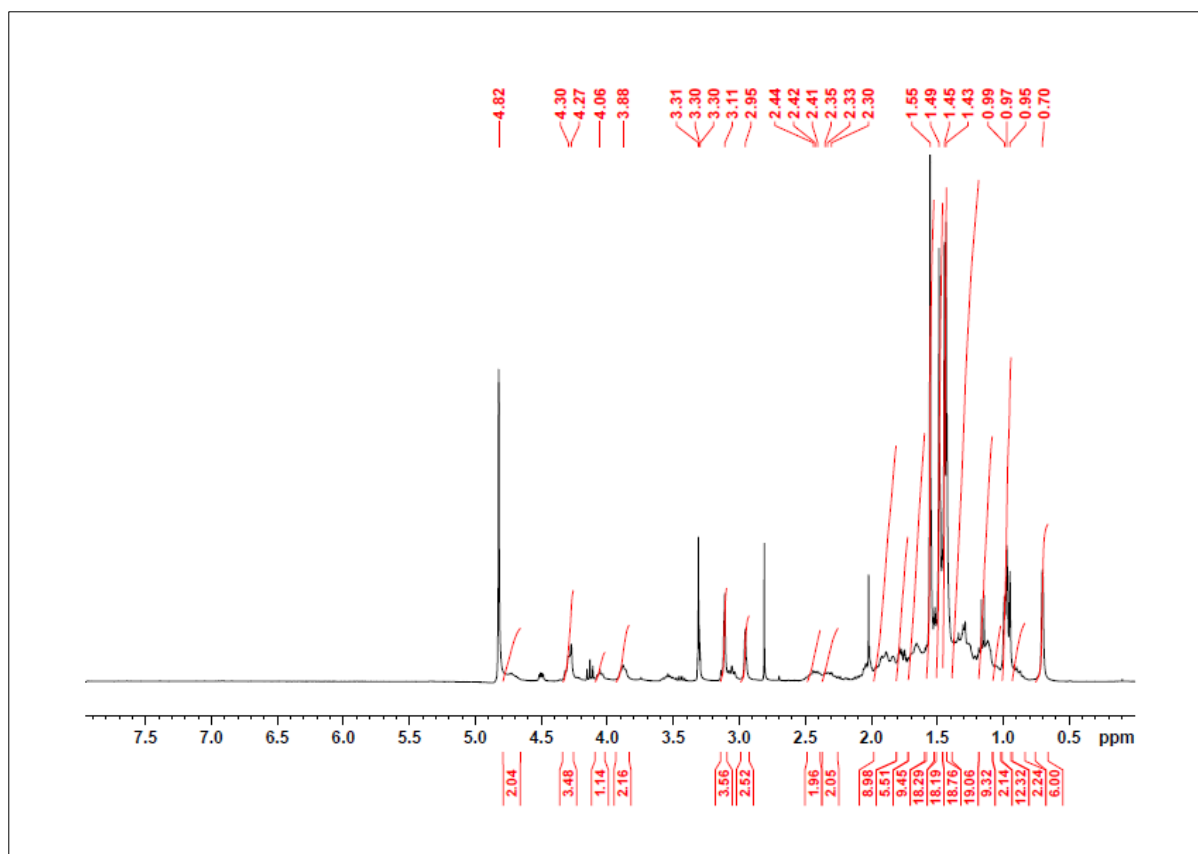


Abbildung 391: ¹H-NMR (300 MHz, MeOD-*d*₄): (N-Boc-arginin(Boc)₂-lithocholsäure-N-methylpropargylamid)-Dimer 96.

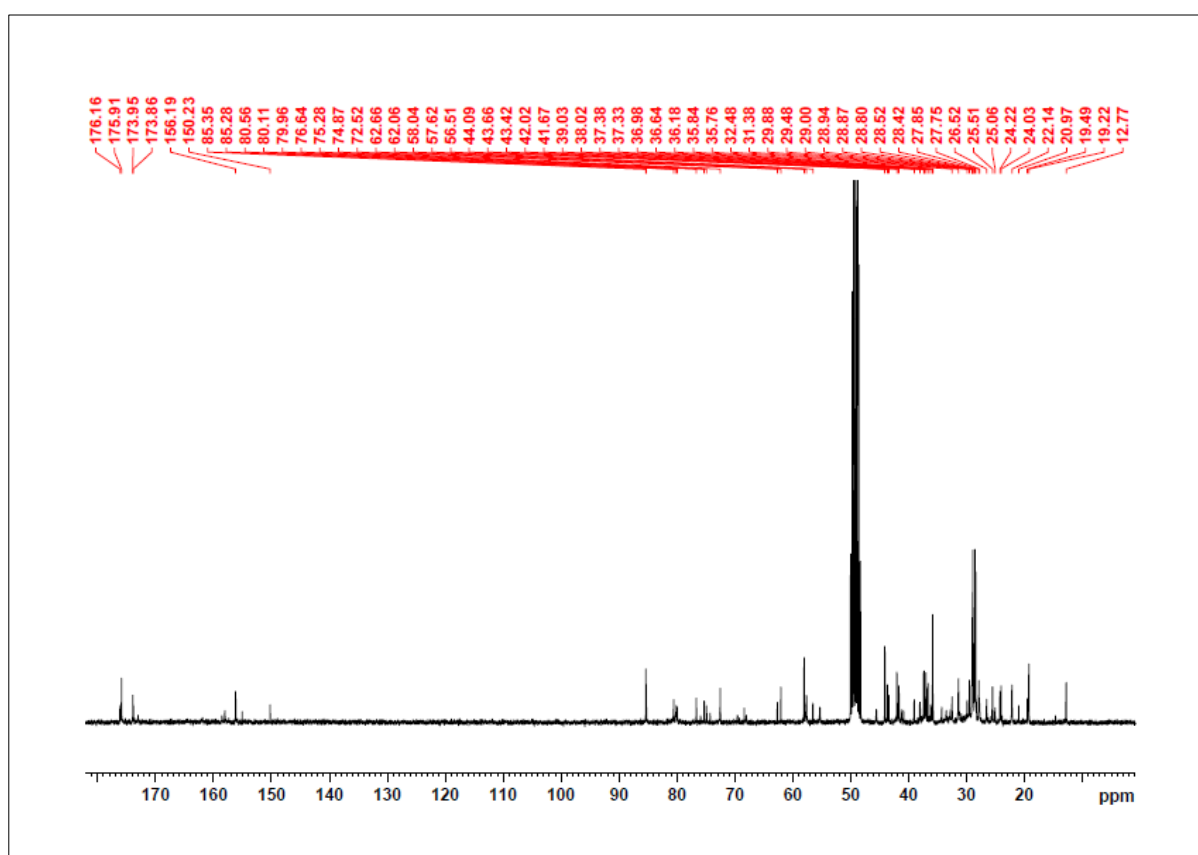
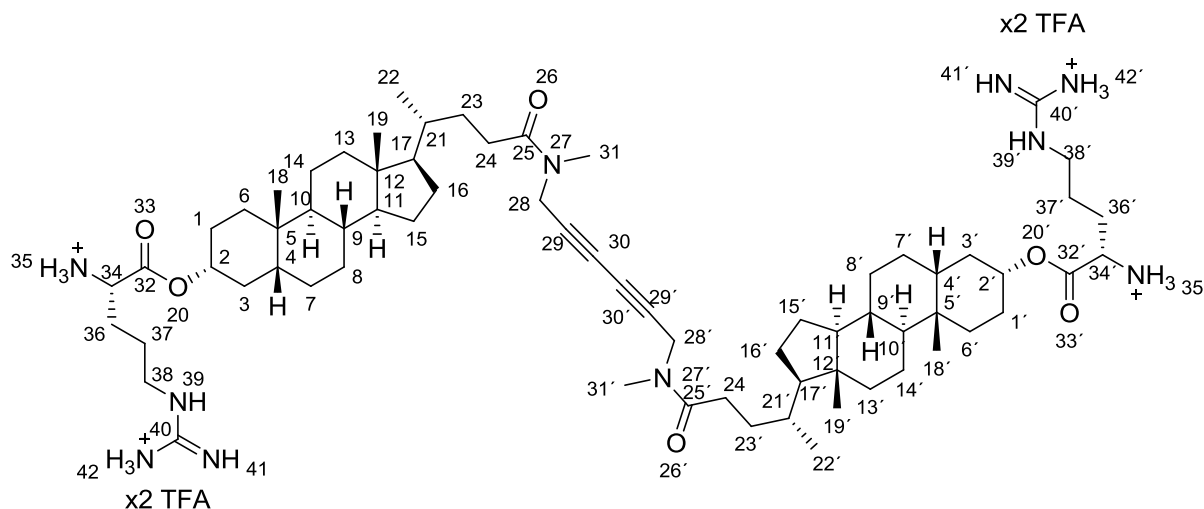


Abbildung 392: ¹³C-NMR (75.4 MHz, MeOD-*d*₄): (N-Boc-arginin(Boc)₂-lithocholsäure-N-methylpropargylamid)-Dimer 96.

5.3.6.10 (Trifluoracetat-arginin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid)-Dimer 97Ansatz:

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
96 (5.3.6.9)	1766.38	1.0	0.057	0.1	
TFA					2.0
CH ₂ Cl ₂					10.0
Benzol					40.0

Durchführung:

0.1 g (0.057 mmol) (Boc-*N*-arginin(Boc₂)-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid)-Dimer **96** wurden in 10 mL Dichlormethan gelöst und mit 2 mL Trifluoressigsäure versetzt. Die Reaktionslösung wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt und der Reaktionsfortschritt mittels DC überprüft. Die Lösung wurde mit 10 mL Benzol verdünnt und anschließend am Rotationsverdampfer auf 2 mL eingengt. Das so erhaltene Konzentrat wurde dreimal mit je 10 mL Benzol aufgenommen und wiederum eingengt, um die überschüssige Trifluoressigsäure im azeotropen Gemisch vollständig zu entfernen. Das Produkt wurde 48 h im Ölpumpenvakuum getrocknet. Es konnten 0.087 g (0.056 mmol) eines farblosen Feststoffs erhalten werden.

Analytik:

Ausbeute: 98 %. **¹H-NMR** (300 MHz, MeOD-*d*₄): δ = 0.71 (s, 6H, H-19, H-19'), 0.96 (d, $^3J_{HH}$ = 6.85 Hz, 6H, H-22, H-22'), 0.99 (s, 6H, H-18, H-18'), 1.03-1.09 (m, 2H, H-6, H-6'), 1.09-1.29 (m, 16H, H-7, H-7', H-8, H-8', H-11, H-11', H-13, H-13', H-14, H-14', H-15, H-15', H-16, H-16', H-17, H-17'), 1.31-1.49 (m, 16H, H-1, H-1', H-4, H-4', H-8, H-8', H-9, H-9', H-10, H-10', H-14, H-14', H-23, H-23), 1.51-1.56 (m, 2H, H-3, H-3'), 1.57-1.61 (m, 2H, H-15, H-15'), 1.66-1.69 (m, 2H, H-1, H-1'), 1.60-1.85 (m, 10H, H-3, H-3', H-6, H-6', H-7, H-7', H-16, H-16', H-21, H-21'), 1.86-2.01 (m, 4H, H-37, H-37'), 1.96-1.99 (m, 2H, H-13, H-13'), 2.00-2.09 (m, 4H, H-36, H-36'), 2.24-2.37 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.38-2.53 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.95 (s, 2H, H-31, H-31'), 3.10 (s, 4H, H-31, H-31'), 3.19 (t, $^3J_{HH}$ = 7.77 Hz, 2H, H-39, H-39'), 4.00 (t, $^3J_{HH}$ = 5.55 Hz, 2H, H-34, H-34'), 4.16 (m, 1.4H, H-28, H-28'), 4.27 (m, 2.6H, H-28, H-28'), 4.81-4.92 (m, 2H, H-2, H-2'). **¹³C-NMR** (75.4 MHz, MeOD-*d*₄): δ = 12.5 (C19, C19'), 19.0 (C22, C22'), 21.9 (C14, C14'), 23.7 (C18, C18'), 24.0 (C15, C15'), 25.3 (C37, C37'), 25.6 (C36, C36'), 27.5 (C8, C8'), 28.1 (C7, C7'), 28.7 (C16, C16'), 29.3 (C24, C24'), 30.1 (C1, C1'), 31.2 (C24, C24'), 31.6 (C23, C23'), 32.3 (C23, C23'), 32.7 (C31, C31'), 33.2 (C31, C31'), 34.1 (C6, C6'), 35.6 (C21, C21'), 35.7 (C5, C5'), 35.9 (C9, C9'), 36.5 (C28, C28'), 36.8 (C3, C3'), 37.2 (C28, C28'), 37.9 (C13, C13'), 40.3 (C10, C10'), 41.1 (C4, C4'), 43.3 (C12, C12'), 43.9 (C38, C38'), 53.7 (C17, C17'), 57.8 (C11, C11'), 58.9 (C34, C34'), 68.1 (C30, C30'), 69.1 (C30, C30'), 72.4 (C2, C2'), 74.7 (C29, C29'), 78.4 (C29, C29'), 158.7 (C40, C40'), 169.7 (C32, C32'), 175.8 (C25, C25'), 176.1 (C25, C25'). **IR** (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3348 (w), 3174 (w), 2930 (m), 2865 (w), 2357 (w), 1738 (m), 1668 (s), 1623 (s), 1452 (m), 1429 (m), 1197 (s), 1178 (s), 1131 (s), 975 (m), 911 (w), 836 (m), 797 (m), 721 (m). **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für C₆₈H₁₁₃N₁₀O₆: m/z 1165.8839, gef.: m/z 1165.8749; ber. für C₆₈H₁₁₄N₁₀O₆: m/z 583.4419, gef.: m/z 583.4503.

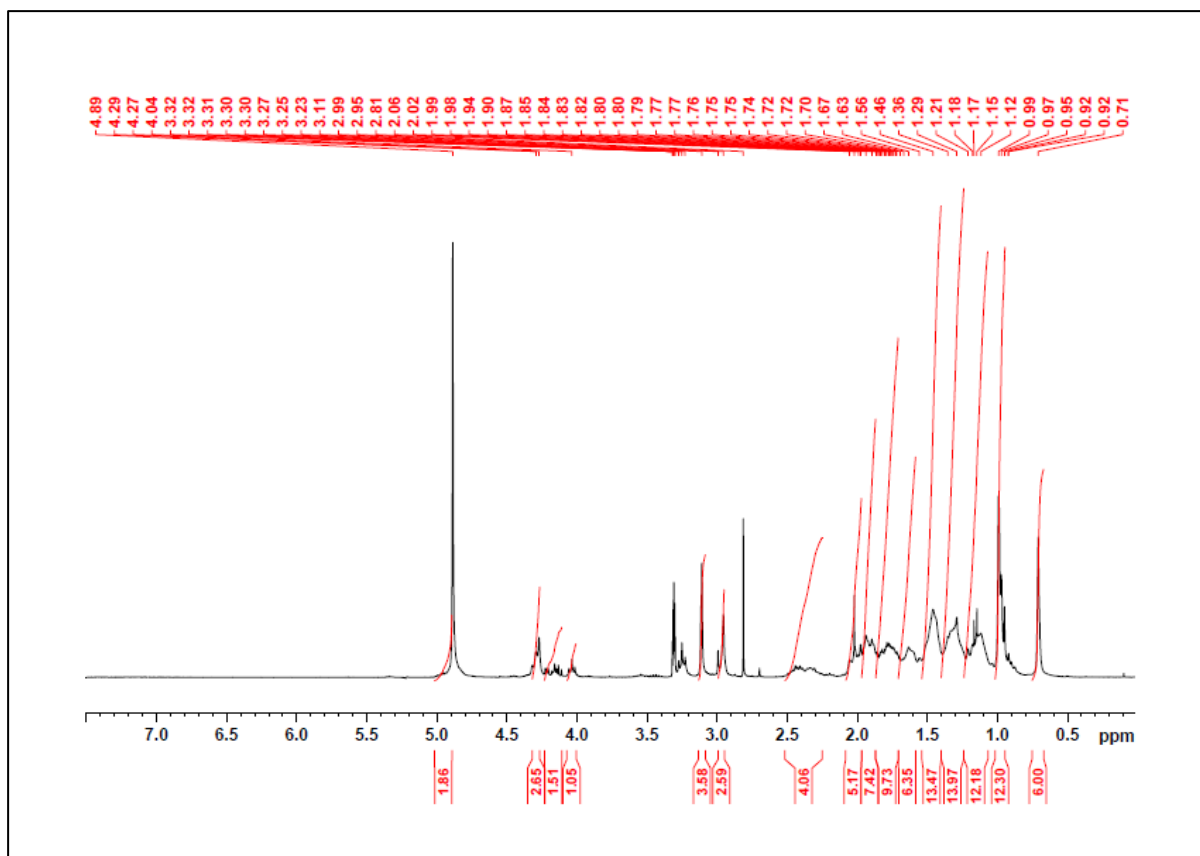


Abbildung 393: ¹H-NMR (300 MHz, MeOD-*d*₄): (Trifluoroacetat-arginin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid)-Dimer 97.

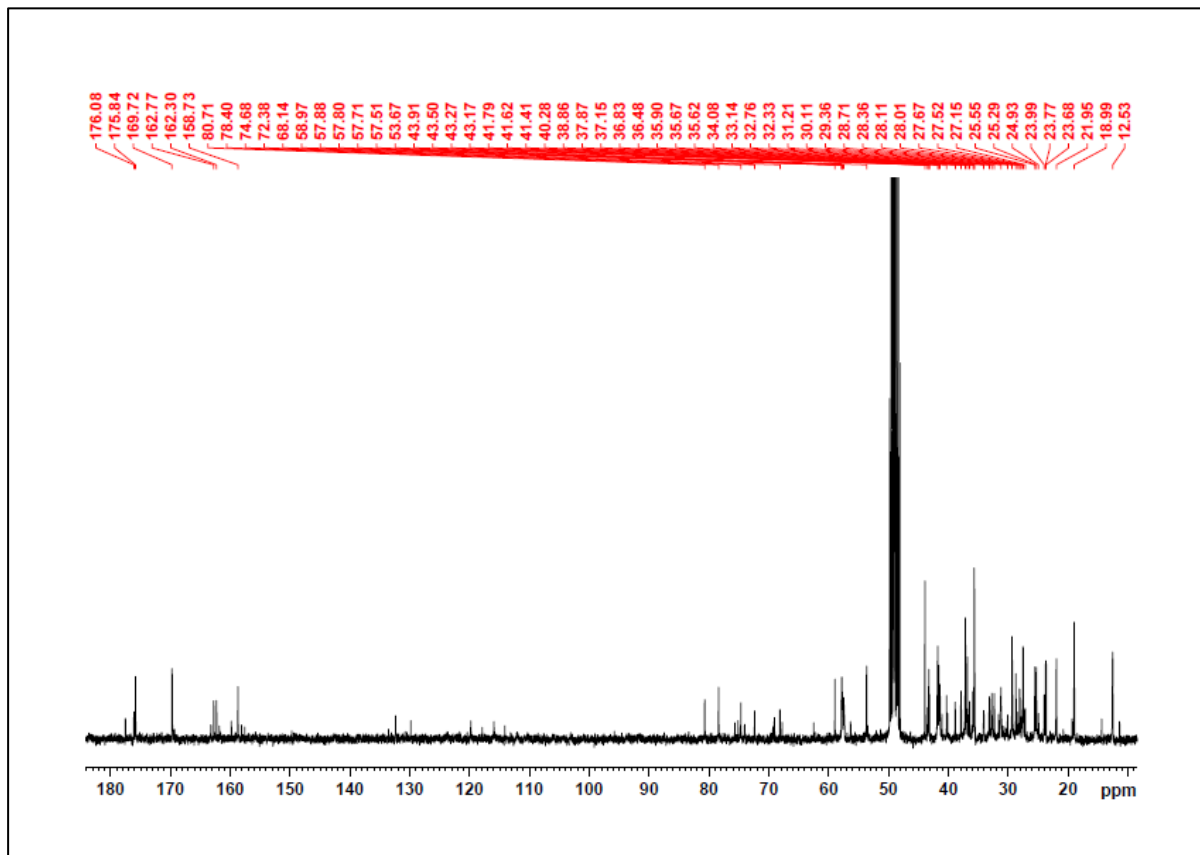
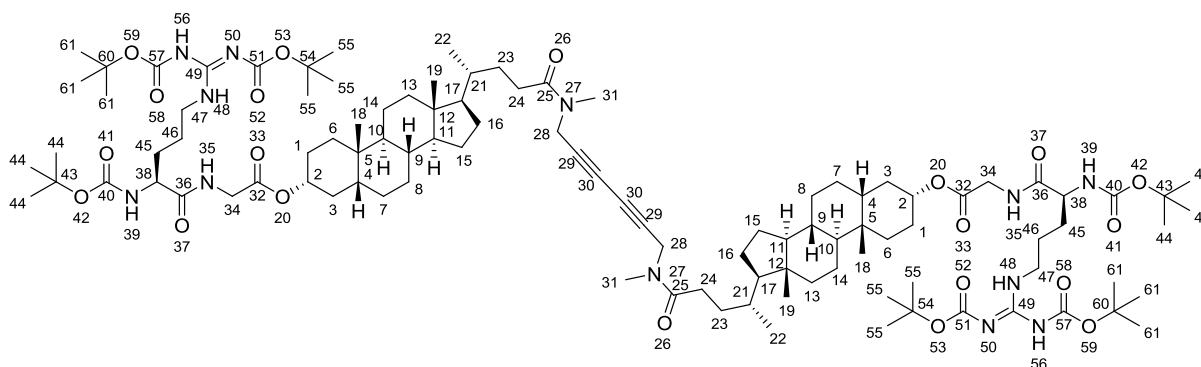


Abbildung 394: ¹³C-NMR (75.4 MHz, MeOD-*d*₄): (Trifluoroacetat-arginin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid)-Dimer 97.

5.3.6.11 (*N*-Boc-arginin(Boc)₂-*N*-glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid)-Dimer 98**Ansatz:**

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
88 (5.3.6.3)	1180.66	1.0	0.087	0.104	
<i>N</i> -Boc-arginin(Boc) ₂ -OH	474.55	3.0	0.261	0.124	
HCTU	413.69	2.4	0.201	0.086	
Cl-HOBt	169.57	5.0	0.435	0.074	
DIEA	129.25	12.0	1.044	0.135	0.182
CH ₂ Cl ₂					10.0
DMF					5.0

Durchführung:

0.124 g *N*-Boc-arginin(Boc)₂-OH (0.087 mmol, 3.0 eq.) wurden in 15 mL eines 2:1-Gemischs aus Dichlormethan und *N,N'*-Dimethylformamid gelöst. Die Lösung wurde im Eisbad auf 0 °C gekühlt und mit 0.086 g HCTU (0.201 mmol, 2.4 eq.) und 0.074 g Cl-HOBt (0.435 mmol, 5.0 eq.) versetzt. Nachdem sich eine klare Lösung gebildet hatte, wurden 0.182 mL DIEA (0.135 g, 1.044 mmol, 12 eq.) zugegeben und das gelbe Gemisch für 10 min bei 0 °C gerührt. Nach Zugabe von 0.104 g (Trifluoracetat-glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid)-Dimer **88** (0.087 mmol, 1.0 eq.) wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmt und für weitere 24 h gerührt. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels DC überprüft. Die Reaktionslösung wurde mit 30 mL Dichlormethan verdünnt. Die organische Phase wurde mit je 60 mL gesättigter NaHCO₃-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden mit Dichlormethan gegenextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das gelbliche Rohprodukt wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet und anschließend säulenchromatographisch gereinigt (*n*-Hexan : Ethylacetat = 1:1). Es wurden 0.127 g (0.068 mmol) eines feinkristallinen, farblosen Feststoffs isoliert.

Analytik:

Ausbeute: 78 %. **R_F:** 0.64 (*n*-Hexan : Ethylacetat = 1:1). **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄ = 1:1): δ = 0.51 (s, 6H, H-19, H-19'), 0.77 (s, 6H, H-18, H-18'), 0.79 (d, ³*J*_{HH} = 8.05 Hz, 6H, H-22, H-22'), 0.82-0.89 (m, 2H, H-6, H-6'), 0.97-1.13 (m, 16H, H-7, H-7', H-8, H-8', H-11, H-11', H-13, H-13', H-14, H-14', H-15, H-15', H-16, H-16', H-17, H-17'), 1.15-1.29 (m, 16H, H-1, H-1', H-4, H-4', H-8, H-8', H-9, H-9', H-10, H-10', H-14, H-14', H-23, H-23'), 1.27 (s, 18H, H-61, H-61'), 1.34 (s, 18H, H-44, H-44'), 1.34-1.38 (m, 2H, H-3, H-3'), 1.37 (s, 18H, H-55, H-55'), 1.41-1.45 (m, 2H, H-15, H-15'), 1.49-1.53 (m, 4H, H-45, H-45'), 1.53-1.56 (m, 2H, H-1, H-1'), 1.57-1.65 (m, 10H, H-3, H-3', H-6, H-6', H-7, H-7', H-16, H-16', H-21, H-21'), 1.66-1.78 (m, 4H, H-46, H-46'), 1.90-1.96 (m, 2H, H-13, H-13'), 2.03-2.15 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.19-2.30 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.95 (s, 2H, H-31, H-31'), 3.18 (s, 4H, H-31, H-31'), 3.67-3.92 (m, 2H, H-47, H-47'), 4.03 (t, ⁴*J*_{HH} = 2.09 Hz, 1.4H, H-28, H-28'), 4.20 (t, ⁴*J*_{HH} = 2.12 Hz, 2.6H, H-28, H-28'), 4.21 (m, 1H, H-38, H-38'), 4.30 (s, 4H, H-33, H-34'), 4.56-4.67 (m, 2H, H-2, H-2'), 6.23 (s, 2H, H-39, H-39'), 7.30 (s, 2H, H-35, H-35'), 7.78 (d, ³*J*_{HH} = 1.84 Hz, 2H, H-48, H-48'), 7.81 (d, ³*J*_{HH} = 8.05 Hz 2H, H-56, H-56'). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄ = 1:1): δ = 11.7 (C19, C19'), 18.6 (C22, C22'), 20.6 (C14, C14'), 23.0 (C18, C18'), 23.9 (C15, C15'), 24.4 (C46, C46'), 26.3 (C45, C45'), 26.9 (C8, C8'), 27.5 (C7, C7'), 27.6 (C44, C44'), 27.8 (C16, C16'), 27.9 (C55, C55'), 28.0 (C60, C60'), 29.0 (C24, C24'), 30.1 (C1, C1'), 30.8 (C24, C24'), 31.1 (C24, C24'), 31.9 (C23, C23'), 33.4 (C23, C23'), 34.3 (C31, C31'), 34.6 (C31, C31'), 34.7 (C6, C6'), 35.0 (C21, C21'), 35.3 (C5, C5'), 35.6 (C9, C9'), 36.6 (C28, C28'), 38.2 (C3, C3'), 39.4 (C28, C28'), 39.9 (C4, C4'), 40.0 (C13, C13'), 40.2 (C28, C28'), 41.3 (C34, C34'), 41.7 (C47, C47'), 42.5 (C12, C12'), 53.6 (C17, C17'), 55.7 (C11, C11'), 56.2 (C38, C38'), 68.6 (C30, C30'), 73.7 (C30, C30'), 75.6 (C2, C2'), 78.9 (C29, C29'), 79.5 (C43, C43'), 79.7 (C54, C54'), 84.3 (C59, C59'), 154.5 (C57, C57'), 155.8 (C40, C40'), 160.5 (C51, C51'), 165.8 (C49, C49'), 168.9 (C32, C32'), 172.9 (C36, C36'), 173.9 (C25, C25'), 174.1 (C25, C25'). **IR** (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3377 (w), 2931 (w), 2866 (w), 2361 (w), 1708 (m), 1645 (m), 1607 (m), 1506 (m), 1454 (m), 1390 (m), 1361 (m), 1273 (s), 1248 (s), 1145 (s), 1094 (s), 1051 (m), 981 (m), 914 (w), 890 (w), 850 (w), 811 (w), 777 (w), 728 (w). **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für C₁₀₂H₁₆₇N₁₂O₂₀: *m/z* 1880.2446, gef.: *m/z* 1881.2587; ber. für C₁₀₂H₁₆₆N₁₂O₂₀Na: *m/z* 1903.2265, gef.: *m/z* 1903.2448; ber. für C₁₀₂H₁₆₇N₁₂O₂₀Na₂: *m/z* 952.1169, gef.: *m/z* 952.1194.

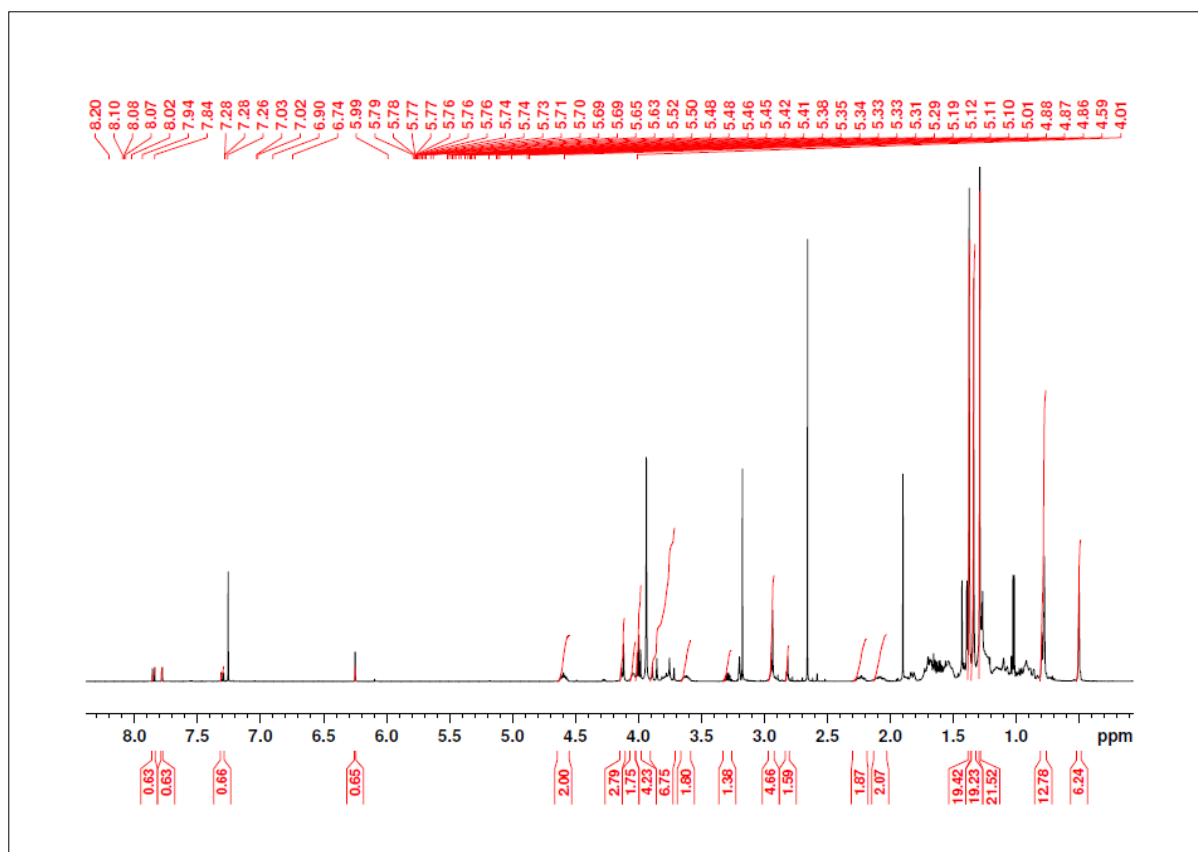


Abbildung 395: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOD-}d_4 = 1:1$): (N-Boc-arginin(Boc) $_2$ -N-glycin-lithocholsäure-N-methylpropargylamid)-Dimer 98.

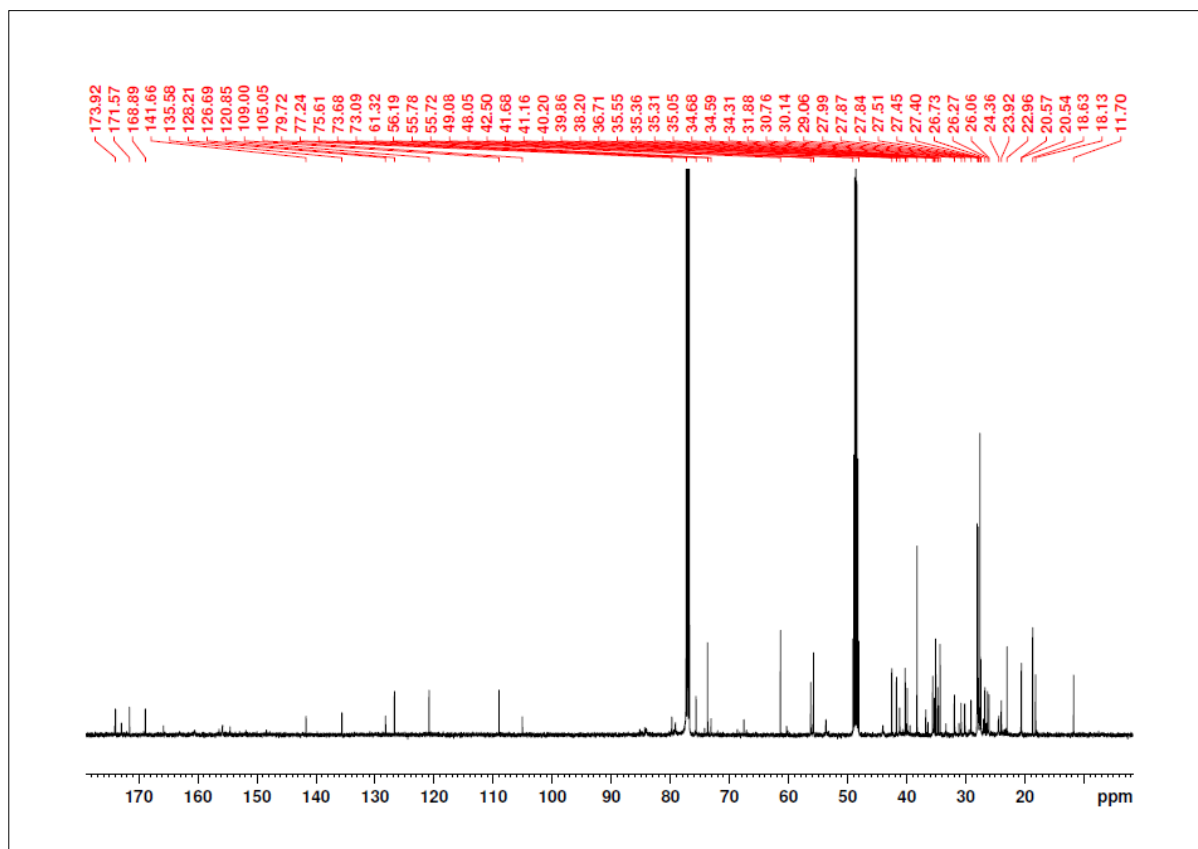
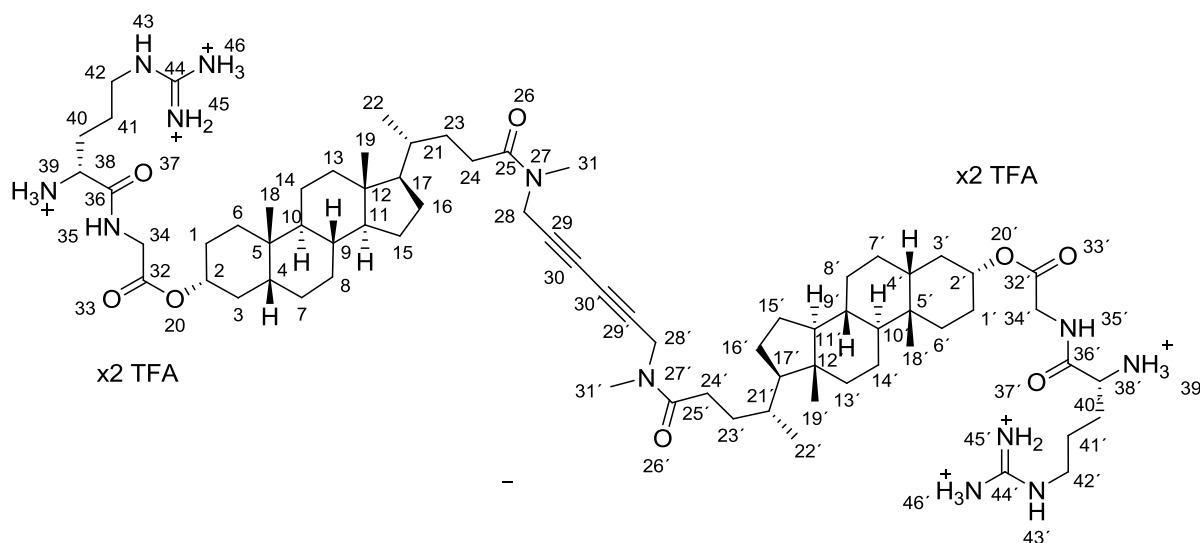


Abbildung 396: $^{13}\text{C-NMR}$ (125.7 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOD-}d_4 = 1:1$): (N-Boc-arginin(Boc) $_2$ -N-glycin-lithocholsäure-N-methylpropargylamid)-Dimer 98.

5.3.6.12 (Trifluoracetat-arginin-*N*-glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid)- Dimer 99



Ansatz:

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
98 (5.3.6.11)	1880.48	1.0	0.032	0.06	
TFA					1.0
CH ₂ Cl ₂					5.0
Benzol					18.0

Durchführung:

0.06 g (*N*-Boc-arginin(Boc)₂-*N*-glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid)-Dimer **98** (0.032 mmol, 1 eq.) wurden in 5 mL Dichlormethan gelöst und mit 1 mL Trifluoressigsäure versetzt. Die Reaktionslösung wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt und der Reaktionsfortschritt mittels DC überprüft. Die Lösung wurde mit 6 mL Benzol verdünnt und anschließend am Rotationsverdampfer auf 2 mL eingengt. Das so erhaltene Konzentrat wurde zweimal mit je 6 mL Benzol aufgenommen und wiederum eingengt, um die überschüssige Trifluoressigsäure im azeotropen Gemisch vollständig zu entfernen. Das Produkt wurde 48 h im Ölpumpenvakuum getrocknet. Es konnten 0.040 g (0.031 mmol) eines farblosen Feststoffs erhalten werden.

Analytik:

Ausbeute: 99 %. **¹H-NMR** (300 MHz, MeOD-*d*₄): δ = 0.71 (s, 6H, H-19, H-19'), 0.98-1.01 (m, 12H, H-18, H-18', H-22, H-22'), 1.01-1.08 (m, 2H, H-6, H-6'), 1.12-1.32 (m, 16H, H-7, H-7', H-8, H-8', H-11, H-11', H-13, H-13', H-14, H-14', H-15, H-15', H-16, H-16', H-17, H-17'), 1.34-1.48 (m, 16H, H-1, H-1', H-4, H-4', H-8, H-8', H-9, H-9', H-10, H-10', H-14, H-14', H-23, H-23'), 1.54-1.58 (m, 2H, H-3, H-3'), 1.60-1.64 (m, 2H, H-15, H-15'), 1.68-1.72 (m, 4H, H-40, H-40'), 1.72-1.74 (m, 2H, H-1, H-1'), 1.75-1.84 (m, 10H, H-3, H-3', H-6, H-6', H-7, H-7', H-16, H-16', H-21, H-21'), 1.85-1.97 (m, 4H, H-41, H-41'), 1.98-2.05 (m, 2H, H-13, H-13'), 2.25-2.38 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.38-2.52 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.98 (s, 2H, H-31, H-31'), 3.11 (s, 4H, H-31, H-31'), 3.24-3.29 (m, 4H, H-42, H-42'), 3.92-4.13 (m, 4H, H-34, H-34'), 3.15-3.24 (m, 2H, H-35, H-35'), 4.23-4.25 (m, 1H, H-28, H-28'), 4.27-4.31 (m, 3H, H-28, H-28'), 4.17 (m, 2H, H-38, H-38'), 4.67-4.83 (m, 2H, H-2, H-2'). **¹³C-NMR** (75.4 MHz, MeOD-*d*₄): δ = 12.7 (C19, C19'), 19.1 (C22, C22'), 20.9 (C14, C14'), 22.1 (C18, C18'), 24.0 (C15, C15'), 25.1 (C41, C41'), 25.2 (C40, C40'), 25.5 (C8, C8'), 27.8 (C7, C7'), 28.3 (C16, C16'), 29.5 (C24, C24'), 29.7 (C1, C1'), 30.3 (C24, C24'), 31.5 (C23, C23'), 31.7 (C23, C23'), 32.5 (C31, C31'), 33.5 (C31, C31'), 34.3 (C6, C6'), 35.8 (C21, C21'), 35.9 (C5, C5'), 36.2 (C9, C9'), 37.0 (C28, C28'), 37.3 (C3, C3'), 39.0 (C28, C28'), 40.3 (C13, C13'), 41.2 (C10, C10'), 42.4 (C4, C4'), 43.5 (C12, C12'), 44.1 (C42, C42'), 54.0 (C17, C17'), 57.6 (C11, C11'), 58.0 (C38, C38'), 62.7 (C34, C34'), 68.1 (C30, C30'), 69.1 (C30, C30'), 72.4 (C2, C2'), 74.7 (C29, C29'), 78.4 (C29, C29'), 170.6 (C32, C32'), 170.7 (C36, C36'), 176.0 (C25, C25'), 176.3 (C25, C25'). **IR** (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3343 (w), 3173 (w), 2933 (m), 2864 (w), 2358 (w), 1742 (m), 1670 (s), 1622 (s), 1453 (m), 1426 (m), 1192 (s), 1171 (s), 1134 (s), 973 (m), 911 (w), 833 (m), 778 (m), 729 (m). **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für C₇₂H₁₂₀N₁₂O₈: m/z 640.4738, gef.: m/z 640.4725.

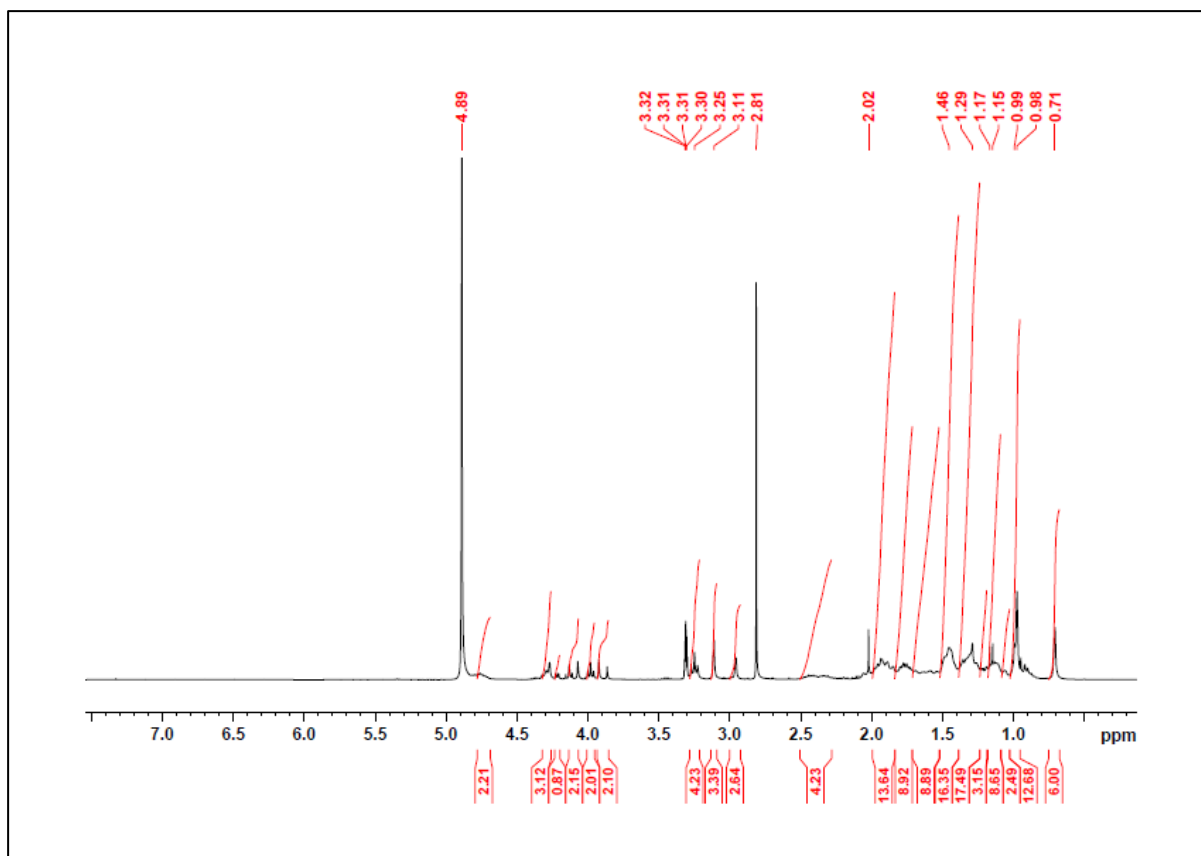


Abbildung 397: ^1H -NMR (300 MHz, $\text{MeOD-}d_4$): (Trifluoracetat-arginin-*N*-glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid)-Dimer 99.

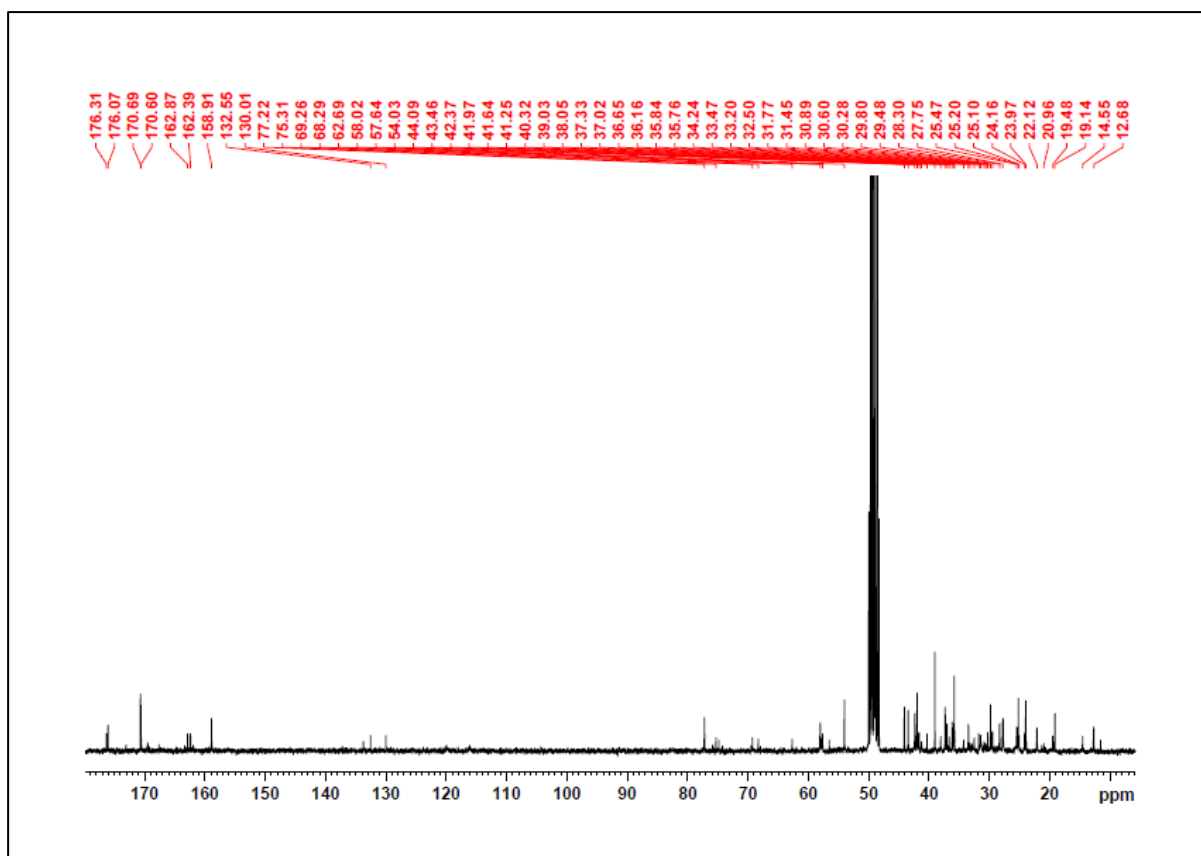
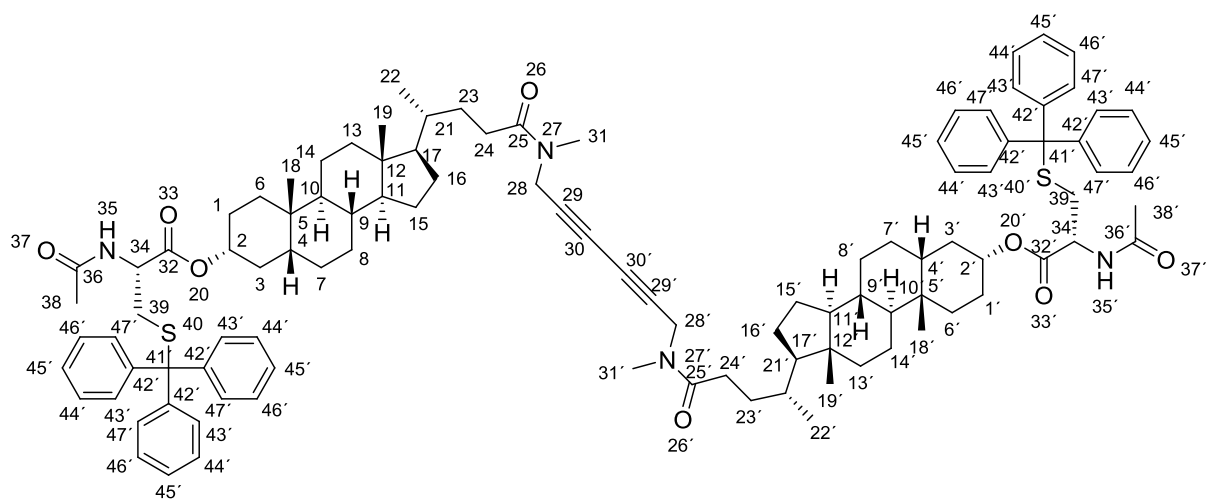


Abbildung 398: ^{13}C -NMR (75.4 MHz, $\text{MeOD-}d_4$): (Trifluoracetat-arginin-*N*-glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid)-Dimer 99.

5.3.6.13 (N-Acetyl-cystein-(S-trityl)-lithocholsäure-N-methylpropargylamid)-Dimer 197**Ansatz:**

Nebenprodukt der Synthese (5.3.1.11).

Durchführung:

Siehe Synthese (5.3.1.11).

Analytik:

Ausbeute: 33 %. **R_F:** 0.8 (*n*-Hexan : Ethylacetat = 1:1). **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ = 0.65 (s, 6H, H-19, H-19'), 0.92 (s, 6H, H-18, H-18'), 0.93 (d, ³*J*_{HH} = 6.82 Hz, 6H, H-22, H-22'), 0.95-1.04 (m, 2H, H-6), 1.06-1.28 (m, 16H, H-7, H-7', H-8, H-8', H-11, H-11', H-13, H-13', H-14, H-14', H-15, H-15', H-16, H-16', H-17, H-17'), 1.25-1.43 (m, 16H, H-1, H-1', H-4, H-4', H-8, H-8', H-9, H-9', H-10, H-10', H-14, H-14', H-23, H-23'), 1.50-1.54 (m, 2H, H-3, H-3'), 1.56-1.60 (m, 2H, H-15, H-15'), 1.65-1.68 (m, 2H, H-1, H-1'), 1.74-1.92 (m, 10H, H-3, H-3', H-6, H-6', H-7, H-7', H-16, H-16', H-21, H-21'), 1.95-1.99 (m, 2H, H-13, H-13'), 1.95 (s, 6H, H-38, H-38'), 2.18-2.29 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.31-2.40 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.48 (dd, ²*J*_{HH} = 12.29 Hz, ³*J*_{HH} = 4.66 Hz, 1H, H-39, H-39'), 2.65 (ddd, ²*J*_{HH} = 12.29 Hz, ³*J*_{HH} = 4.66 Hz, ³*J*_{HH} = 5.61 Hz, 1H, H-39, H-39'), 2.97 (s, 2H, H-31, H-31'), 3.04 (s, 4H, H-31, H-31'), 4.10 (s, 1.2H, H-28, H-28'), 4.29 (d, 2.8H, H-28, H-28'), 4.55-4.60 (m, 1H, H-34, H-34'), 4.70-4.76 (m, 2H, H-2, H-2'), 6.00 (d, ³*J*_{HH} = 7.74 Hz, 1H, H-35, H-35'), 7.19-7.30 (m, 18H, H-42, H-42', H-44, H-44', H-46, H-46'), 7.35-7.40 (m, 12H, H-43, H-43', H-45, H-45'). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, CDCl₃): δ = 12.2 (C19, C19'), 18.6 (C22, C22'), 21.0 (C14, C14'), 23.2 (C38, C38'), 23.4 (C18, C18'), 24.3 (C15, C15'), 26.3 (C8, C8'), 26.6 (C7, C7'), 27.1 (C16, C16'), 28.4 (C24, C24'), 30.4 (C1, C1'), 31.1 (C24, C24'), 32.1 (C23, C23'), 32.2 (C23, C23'), 33.6 (C31, C31'), 34.2 (C31, C31'), 34.7 (C6, C6'), 35.0 (C21, C21'), 35.6 (C5, C5'), 35.8 (C9, C9'), 35.9 (C28, C28'), 36.9 (C3, C3'), 38.8 (C28, C28'), 40.3 (C13, C13'), 40.5 (C10, C10'), 42.0 (C4, C4'), 42.9 (C12, C12'), 51.3 (C34, C34'), 56.2 (C17, C17'), 56.6 (C11, C11'), 66.8 (C40, C40'), 71.8 (C29, C29'), 73.7 (C30, C30'), 76.3 (C2, C2'), 126.9 (C43, C43'), 128.1 (C42, C42', C46, C46'), 129.6 (C43, C43', C45, C45'), 144.4 (C41, C41'), 169.6 (C36, C36'), 170.1 (C32, C32'), 173.4 (C25, C25'). **IR** (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3290 (w), 2930 (m), 2862 (m), 2359 (m), 2337 (m), 1734 (m), 1643 (s), 1488 (m), 1445 (m), 1376 (w), 1335 (w), 1258 (w), 1206 (m), 1182 (m), 1116 (w), 1069 (w), 1035 (w), 980 (w), 910 (m), 854 (w), 728 (s), 699 (s), 675 (m). **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für C₁₀₄H₁₃₁N₄O₈S₂: m/z 1628.9435, gef.: m/z 1628.9376; ber. für C₁₀₄H₁₃₀N₄O₈S₂Na: m/z 1650.9255, gef.: m/z 1650.9173.

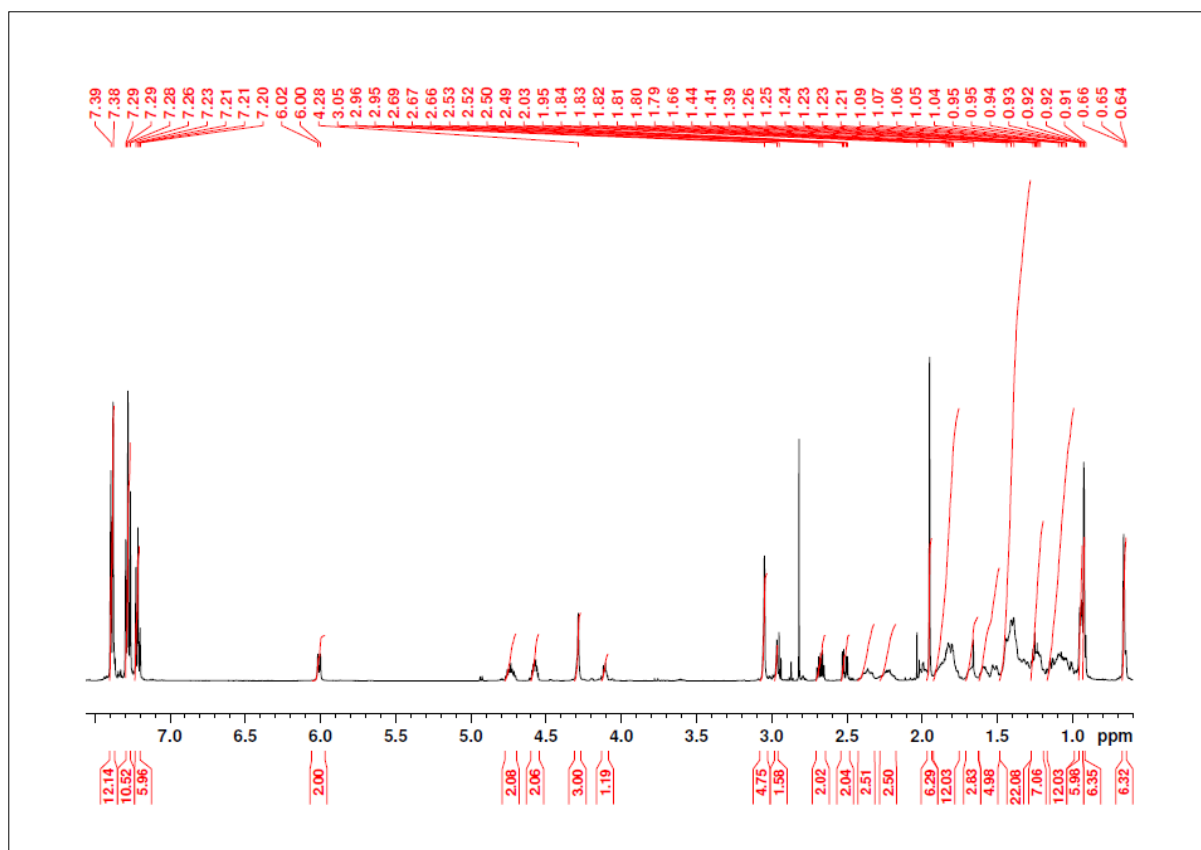


Abbildung 399: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): (N-Acetyl-cystein-(S-trityl)-lithocholsäure-N-methylpropargylamid)-Dimer 197.

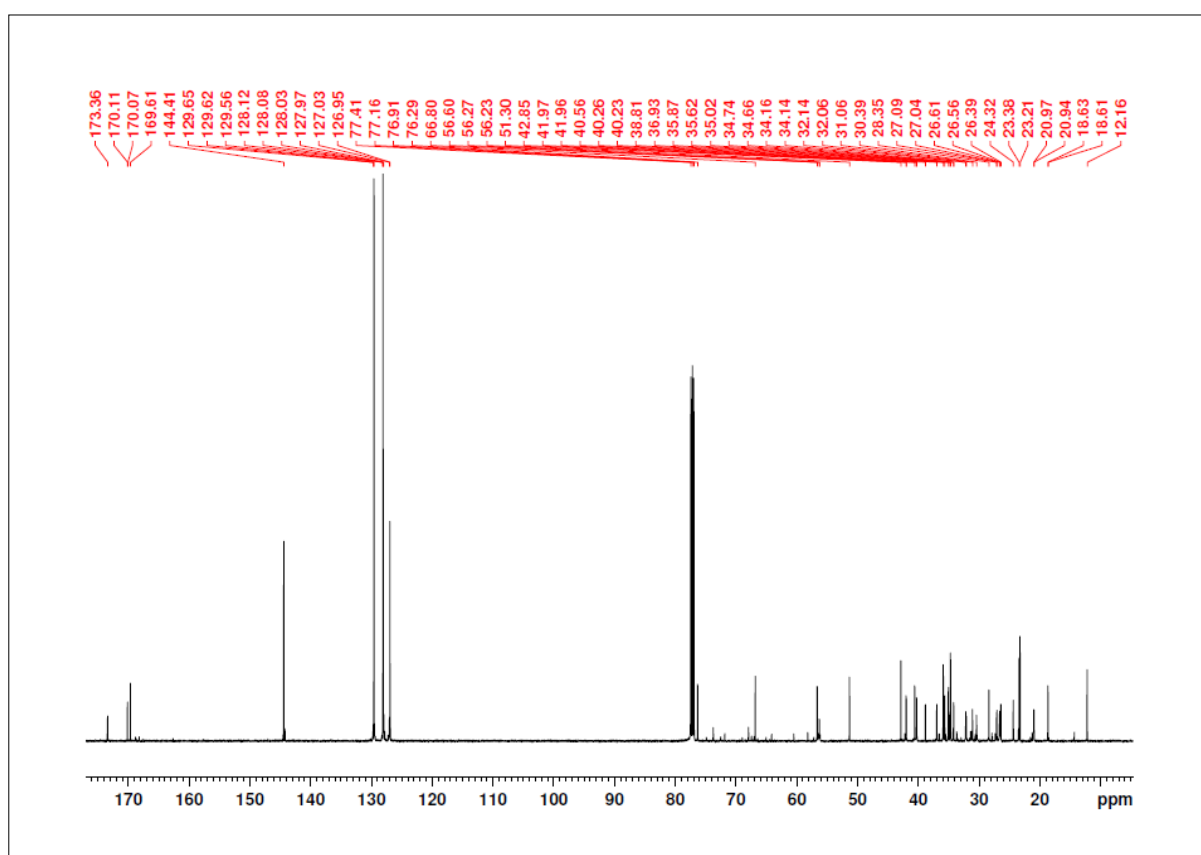
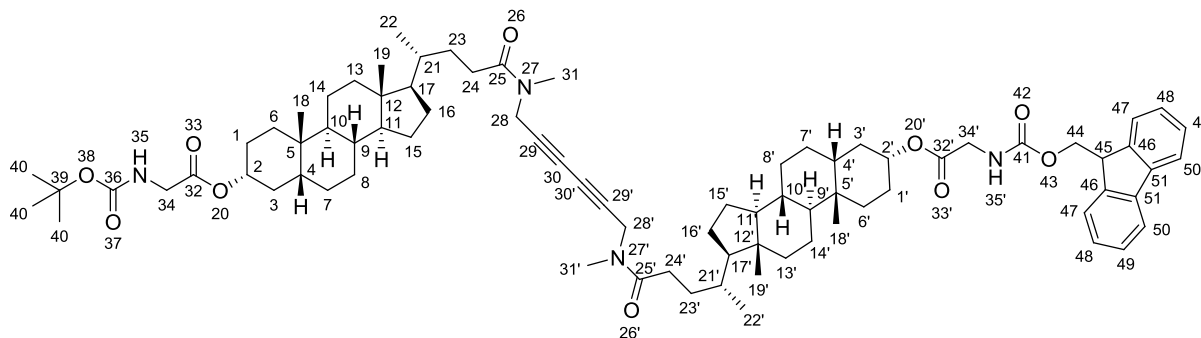


Abbildung 400: ¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃): (N-Acetyl-cystein-(S-trityl)-lithocholsäure-N-methylpropargylamid)-Dimer 197.

5.3.7 Synthese der unsymmetrischen Transmembranbausteine

5.3.7.1 *N*-Fmoc-(glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-*N*-Boc 104



Ansatz:

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
72 (5.3.1.2)	584.83	1.0	0.341	0.200	
103 (5.3.1.12)	706.95	1.0	0.341	0.241	
CuCl	99.00	4.0	1.364	0.135	
TMEDA	116.20	4.0	1.364	0.162	0.21
CH ₂ Cl ₂					15.0

Durchführung:

0.2 g *N*-Boc-glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid **72** (0.341 mmol, 2 eq.) und 0.241 g *N*-Fmoc-glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid **103** (0.341 mmol, 1 eq.) wurden in 15 mL Dichlormethan gelöst. Zu dieser Lösung wurde 0.135 g Kupfer(I)chlorid (1.364 mmol, 4 eq.) und 0.21 mL *N,N,N',N'*-Tetramethylethyldiamin (0.162 g, 1.364 mmol, 4 eq.) zugegeben. Es wurde solange bei Raumtemperatur gerührt, bis das Kupfer(I)chlorid vollständig in Lösung gegangen war. Hierbei färbte sich die Lösung hellgrün. Danach wurde die Atmosphäre über der Reaktionslösung mit Sauerstoff gesättigt. Die tiefblaue Lösung wurde weitere 15 h bei Raumtemperatur gerührt und der Reaktionsverlauf mittels DC überprüft. Nach vollständiger Umsetzung der Edukte wurde das Reaktionsgemisch auf 25 mL gesättigte Ammoniumchlorid-Lösung gegossen, die organische Phase abgetrennt und zwei weitere Male mit gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden mit Dichlormethan gegenextrahiert und die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet. Das Trocknungsmittel wurde abgetrennt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt. Die drei entstandenen Dimere wurden säulenchromatographisch getrennt (*n*-Hexan:Ethylacetat = 2:1; Dichlormethan : Methanol = 30:1).

Es konnten 0.05 g (0.044 mmol) des gewünschten Dimers **104** in Form eines farblosen, feinkristallinen Feststoffs isoliert werden (geringe Mengen DMF).

Analytik:

Ausbeute: 45 %. **R_F:** 0.16 (*n*-Hexan : Ethylacetat = 1:1). **¹H-NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ = 0.62 (s, 3H, H-19), 0.63 (s, 3H, H-19'), 0.91 (m, 12H, H-18, H-18', H-22, H-22'), 0.92-1.23 (m, 18H, H-6, H-6', H-7, H-7', H-8, H-8', H-11, H-11', H-13, H-13', H-14, H-14', H-15, H-15', H-16, H-16', H-17, H-17'), 1.25-1.43 (m, 16H, H-1, H-1', H-4, H-4', H-8, H-8', H-9, H-9', H-10, H-10', H-14, H-14', H-23, H-23'), 1.45 (s, 9H, H-40), 1.45-1.49 (m, 2H, H-3, H-3'), 1.51-1.55 (m, 2H, H-15, H-15'), 1.60-1.63 (m, 2H, H-1, H-1'), 1.69-1.87 (m, 10H, H-3, H-3', H-6, H-6', H-7, H-7', H-16, H-16', H-21, H-21'), 1.90-1.99 (m, 2H, H-13, H-13'), 2.14-2.28 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.31-2.47 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.96 (s, 2H, H-31, H-31'), 3.04 (s, 4H, H-31, H-31'), 3.87 (d, $^3J_{HH} = 5.57$ Hz, 2H, H-34), 3.96 (d, $^3J_{HH} = 5.57$ Hz, 2H, H-34'), 4.11 (s, 1H, H-28, H-28'), 4.29 (s, 3H, H-28, H-28'), 4.71-4.88 (m, 2H, H-2, H-2'), 5.01 (t, $^3J_{HH} = 4.17$ Hz, 1H, H-35), 5.36 (t, $^3J_{HH} = 4.87$ Hz, 1H, H-35'), 7.30 (dd, $^3J_{HH} = 7.4$ Hz, $^3J_{HH} = 7.4$ Hz, 2H, H-48), 7.40 (dd, $^3J_{HH} = 7.4$ Hz, $^3J_{HH} = 7.4$ Hz, 2H, H-49), 7.60 (d, $^3J_{HH} = 7.4$ Hz, 2H, H-47), 7.75 (d, $^3J_{HH} = 7.4$ Hz, 2H, H-50). **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für C₈₀H₁₁₃N₄O₁₀: m/z 1290.8431, gef.: m/z 1290.8473.

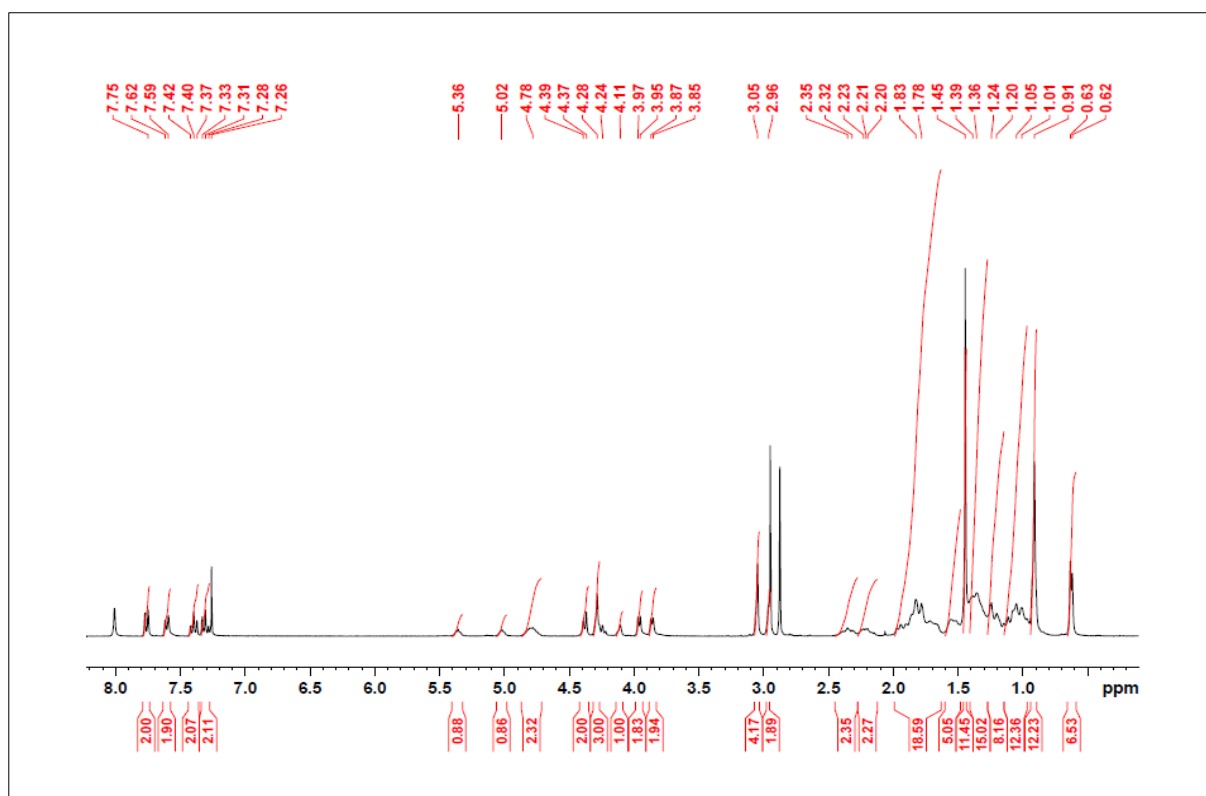
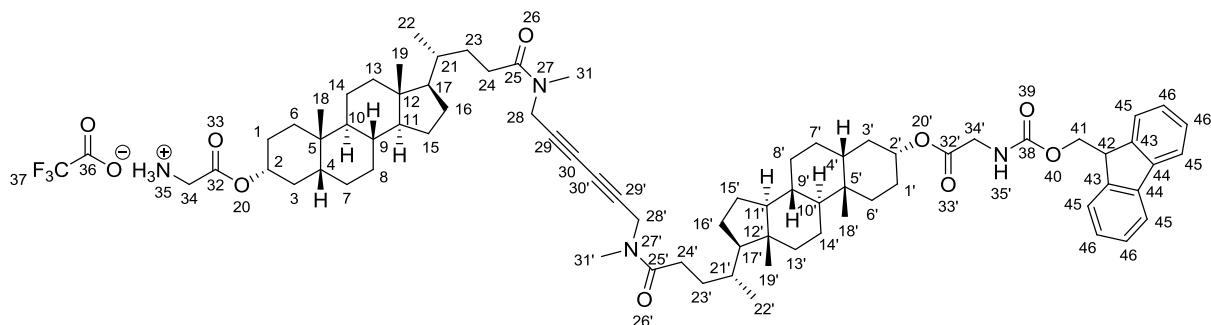


Abbildung 401: ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): N-Fmoc-(glycine-lithocholsäure-N-methylpropargylamid-Dimer)-N-Boc **104**.

5.3.7.2 *N*-Fmoc-(glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-trifluoracetat **105**



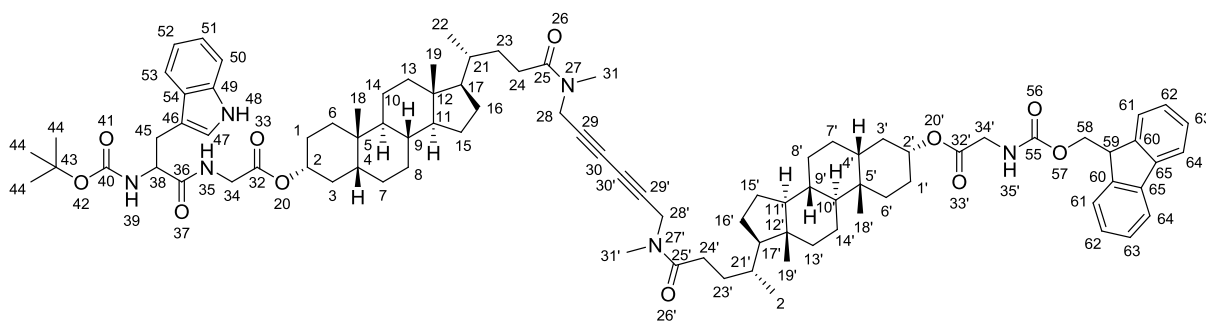
Ansatz:

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
104 (5.3.7.1)	1289.77	1.0	0.041	0.054	
TFA					2.0
CH ₂ Cl ₂					10.0
Benzol					40.0

Durchführung:

0.054 g *N*-Fmoc-(glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-*N*-Boc **104** (0.041 mmol, 1 eq.) wurden in 10 mL Dichlormethan gelöst und mit 2 mL Trifluoressigsäure versetzt. Die Reaktionslösung wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt und der Reaktionsfortschritt mittels DC überprüft. Die Lösung wurde mit 10 mL Benzol verdünnt und anschließend am Rotationsverdampfer auf 2 mL eingengt. Das so erhaltene Konzentrat wurde dreimal mit je 10 mL Benzol aufgenommen und wiederum eingengt, um die überschüssige Trifluoressigsäure im azeotropen Gemisch vollständig zu entfernen. Das Produkt wurde 48 h im Ölpumpenvakuum getrocknet. Es konnten 0.052 g (0.04 mmol) eines rötlichen Feststoffs erhalten werden. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung in der nächsten Stufe umgesetzt.

5.3.7.3 *N*-Fmoc-(glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-tryptophan-*N*-Boc 106



Ansatz:

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
<i>N</i> -Boc-tryptophan-OH	304.34	1.5	0.058	0.018	
105 (5.3.7.2)	1303.67	1.0	0.038	0.052	
HCTU	413.69	1.2	0.046	0.019	
Cl-HOBt	169.57	2.5	0.096	0.016	
DIEA	129.25	6.0	0.230	0.03	0.04
CH ₂ Cl ₂					10.0
DMF					5.0

Durchführung:

0.018 g *N*-Boc-tryptophan-OH (0.058 mmol, 1.5 eq.) wurden in 15 mL eines 2:1-Gemischs aus Dichlormethan und *N,N'*-Dimethylformamid gelöst. Die Lösung wurde im Eisbad auf 0 °C gekühlt und mit 0.019 g HCTU (0.046 mmol, 1.2 eq.) und 0.016 g Cl-HOBt (0.096 mmol, 2.5 eq.) versetzt. Nachdem sich eine klare Lösung gebildet hatte, wurden 0.04 mL DIEA (0.03 g, 0.230 mmol, 6 eq.) zugegeben und das gelbe Gemisch für 10 min bei 0 °C gerührt. Nach Zugabe von 0.052 g *N*-Fmoc-(glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-trifluoracetat **105** (0.038 mmol, 1.0 eq.) wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmt und für weitere 24 h gerührt. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels DC überprüft. Die Reaktionslösung wurde mit 15 mL Dichlormethan verdünnt. Die organische Phase wurde mit je 30 mL gesättigter NaHCO₃-Lösung, 1 M Salzsäure und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden mit Dichlormethan gegenextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das gelbliche Rohprodukt wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet und anschließend säulenchromatographisch gereinigt (*n*-Hexan : Ethylacetat = 1:1). Es wurden 0.016 g (0.011 mmol) eines feinkristallinen, farblosen Feststoffs isoliert.

Analytik:

Ausbeute: 29 %. **R_F:** 0.16 (*n*-Hexan : Ethylacetat = 1:1). **¹H-NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ = 0.64 (s, 6H, H-18, H-18'), 0.85-0.88 (m, 2H, H-6, H-6'), 0.91 (d, $^3J_{HH}$ = 6.67 Hz, 6H, H-22, H-22'), 0.92 (s, 6H, H-19, H-19'), 1.02-1.25 (m, 16H, H-7, H-7', H-8, H-8', H-11, H-11', H-13, H-13', H-14, H-14', H-15, H-15', H-16, H-16', H-17, H-17'), 1.25-1.47 (m, 16H, H-1, H-1', H-4, H-4', H-8, H-8', H-9, H-9', H-10, H-10', H-14, H-14', H-23, H-23'), 1.40 (s, 9H, H-44), 1.47-2.05 (m, 18H, H-1, H-1', H-3, H-3', H-6, H-6', H-7, H-7', H-13, H-13', H-15, H-15', H-16, H-16', H-21, H-21'), 2.15-2.31 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.31-2.46 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.98 (s, 2H, H-31, H-31'), 3.01 (s, 4H, H-31, H-31'), 3.06-3.47 (m, 2H, H-34), 3.86 (m, 2H, H-45), 4.13 (s, 1.2H, H-28, H-28'), 4.24 (t, $^3J_{HH}$ = 7.38 Hz, 1H, H-59), 4.39 (d, $^3J_{HH}$ = 7.38 Hz, 2H, H-58), 4.30 (s, 2.8H, H-28, H-28'), 4.44- 4.52 (m, 1H, H-38), 4.66-4.77 (m, 1H, H-2), 4.77-4.88 (m, 1H, H-2'), 5.13 (bs, 1H, H-39), 5.28 (m, 2H, H-58), 6.18 (s, 1H, H-35'), 7.10 (t, $^3J_{HH}$ = 7.11 Hz, 1H, H-51), 7.12-7.78 (m, 13H, H-47, H-50, H-51, H-52, H-53, H-61, H-62, H-63, H-64).

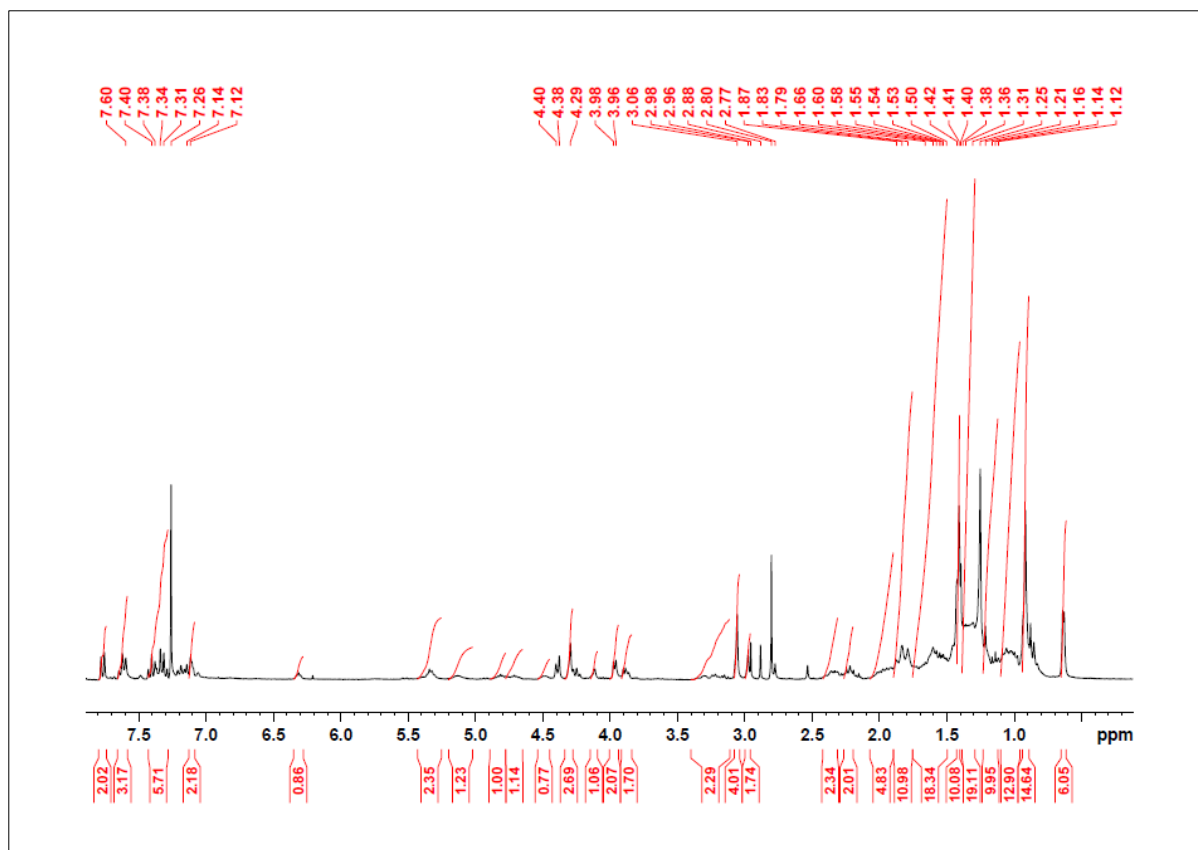
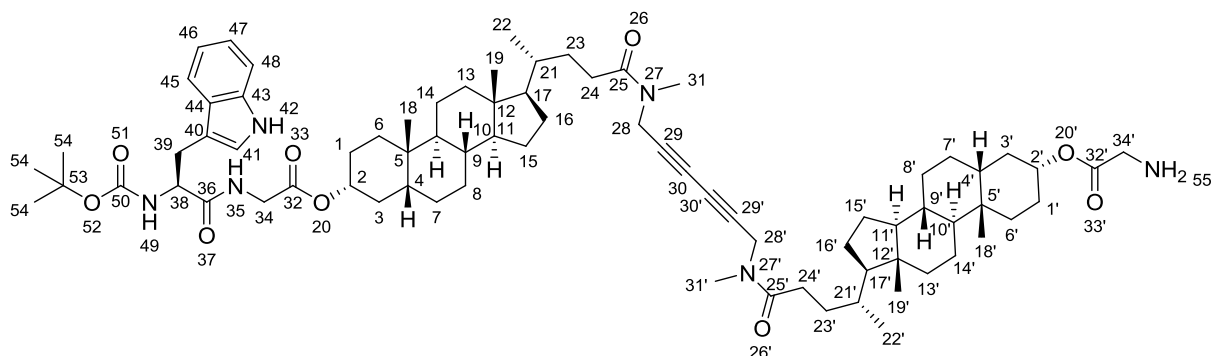


Abbildung 402: ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): N-Fmoc-(glycin-lithocholsäure-N-methylpropargylamid-Dimer)-Boc-N-tryptophan 106.

5.3.7.4 *N*-Boc-tryptophan-(glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-NH₂ **107****Ansatz:**

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
106 (5.3.7.3)	1475.98	1.0	0.011	0.016	
Piperidin	85.15	5 Vol%	6.83	0.58	0.5
CH ₂ Cl ₂					10.0

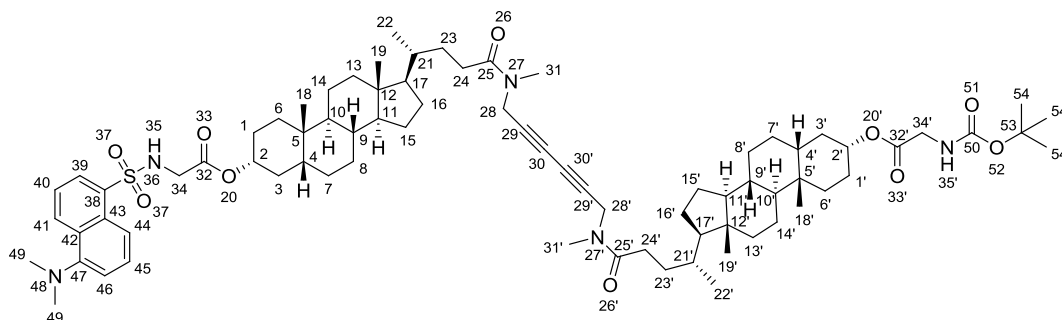
Durchführung:

0.1 g *N*-Fmoc-(glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-Boc-*N*-tryptophan **106** (0.011 mmol, 1 eq.) wurden in 10 mL Dichlormethan gelöst. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit 0.5 mL Piperidin (5 Vol.-%, 6.83 mmol) versetzt und 15 h bei RT gerührt. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels DC überprüft. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt im Ölpumpenvakuum getrocknet. Die entschützte Verbindung **107** wurde ohne weitere Aufreinigung umgesetzt.

Analytik:

Ausbeute: 99 %. **R_F:** 0.23 (*n*-Hexan : Ethylacetat = 1:1).

5.3.7.5 *N*-Dansyl-(glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-*N*-Boc 101



Ansatz:

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
72 (5.3.1.2)	584.83	2.0	0.529	0.310	
100 (5.3.3.1)	718.00	1.0	0.265	0.190	
CuCl	99.00	5.0	1.323	0.131	
TMEDA	116.20	5.0	1.323	0.154	0.20
CH ₂ Cl ₂					15.0

Durchführung:

0.310 g *N*-Boc-glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid **72** (0.529 mmol, 2 eq.) und 0.190 g *N*-Dansyl-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid **100** (0.265 mmol, 1 eq.) wurden in 15 mL Dichlormethan gelöst. Zu dieser Lösung wurde 0.131 g Kupfer(I)chlorid (1.323 mmol, 5 eq.) und 0.20 mL *N,N,N',N'*-Tetramethylethyldiamin (0.154 g, 1.323 mmol, 5 eq.) zugegeben. Es wurde solange bei Raumtemperatur gerührt, bis das Kupfer(I)chlorid vollständig in Lösung gegangen war. Hierbei färbte sich die Lösung hellgrün. Danach wurde die Atmosphäre über der Reaktionslösung mit Sauerstoff gesättigt. Die tiefblaue Lösung wurde weitere 3 h bei Raumtemperatur gerührt und der Reaktionsverlauf mittels DC überprüft. Nach vollständiger Umsetzung der Edukte wurde das Reaktionsgemisch auf 50 mL gesättigte Ammoniumchlorid-Lösung gegossen, die organische Phase abgetrennt und zwei weitere Male mit gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden mit Dichlormethan gegenextrahiert und die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt. Die drei entstandenen Dimere wurden säulenchromatographisch getrennt (*n*-Hexan : Ethyl-acetat = 1:1). Es konnten 0.05 g (0.038 mmol) des gewünschten Dimers **101** in Form eines farblosen, feinkristallinen Feststoffs isoliert werden.

Analytik:

Ausbeute: 15 %. **R_F:** 0.42 (*n*-Hexan : Ethylacetat = 1:1). **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ = 0.63 (s, 3H, H-19), 0.65 (s, 3H, H-19'), 0.92 (s, 6H, H-18, H-18'), 0.95 (m, 6H, H-22, H-22'), 0.99-1.13 (m, 2H, H-6, H-6'), 1.14-1.23 (m, 16H, H-7, H-7', H-8, H-8', H-11, H-11', H-13, H-13', H-14, H-14', H-15, H-15', H-16, H-16', H-17, H-17'), 1.27-1.51 (m, 16H, H-1, H-1', H-4, H-4', H-8, H-8', H-9, H-9', H-10, H-10', H-14, H-14', H-23, H-23'), 1.45 (s, 9H, H-54), 1.53-1.62 (m, 2H, H-3, H-3'), 1.63-1.70 (m, 2H, H-15, H-15'), 1.71-1.76 (m, 2H, H-1, H-1'), 1.77-1.94 (m, 10H, H-3, H-3', H-6, H-6', H-7, H-7', H-16, H-16', H-21, H-21'), 1.99-2.04 (m, 2H, H-13, H-13'), 2.19-2.33 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.33-2.46 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.89 (s, 6H, H-49), 2.97 (s, 2H, H-31, H-31'), 3.05 (s, 4H, H-31, H-31'), 3.74 (d, ³J_{HH} = 5.32 Hz, 2H, H-34'), 3.86 (d, ³J_{HH} = 5.31 Hz, 2H, H-34), 4.11 (s, 1.2H, H-28, H-28'), 4.31 (m, 2.8H, H-28, H-28'), 4.54-4.67 (m, 1H, H-2'), 4.75-4.81 (m, 1H, H-2), 5.01 (s, 1H, H-35'), 5.31 (s, 1H, H-35), 7.19 (d, ³J_{HH} = 7.92 Hz, 2H, H-44, H-44'), 7.51 (t, ³J_{HH} = 7.92 Hz, 2H, H-45), 7.59 (t, ³J_{HH} = 7.92 Hz, 2H, H-40), 8.24 (dd, ³J_{HH} = 7.21 Hz, ⁵J_{HH} = 1.34 Hz, 2H, H-41), 8.31 (d, ³J_{HH} = 8.67 Hz, 2H, H-46), 8.56 (d, ³J_{HH} = 8.56 Hz, 2H, H-39). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, CDCl₃): δ = 12.2 (C19), 13.9 (C19'), 18.7 (C22), 19.2 (C22'), 21.0 (C14, C14'), 23.4 (C18), 23.5 (C18'), 24.3 (C15, C15'), 26.4 (C8, C8'), 26.4 (C7, C7'), 27.0 (C16), 27.1 (C16'), 28.4 (C1, C1'), 28.5 (C54), 30.5/30.6 (C23, C23'), 31.1 (C24, C24'), 31.4 (C24, C24'), 32.0 (C23, C23'), 33.6 (C31, C31'), 34.6 (C5, C5'), 34.7 (C31, C31'), 34.8 (C6, C6'), 35.0/35.1 (C21, C21'), 35.7/35.9 (C9, C9'), 36.8 (C3, C3'), 40.3 (C13, C13'), 40.5 (C28, C28'), 40.6 (C10, C10'), 41.9/42.0 (C34, C34'), 42.9 (C4, C4'), 44.7 (C12, C12'), 45.6 (C49), 56.3 (C17, C17'), 56.6 (C11, C11'), 64.5 (C30, C30'), 69.3 (C30, C30'), 69.3 (C29, C29'), 75.8 (C2), 76.5 (C2'), 78.3 (C29, C29'), 80.0 (C53), 115.4 (C44), 119.0 (C40), 123.2 (C45), 128.6 (C40), 129.8 (C41), 129.9 (C42), 130.0 (C47), 131.0 (C46), 134.3 (C38), 152.1 (C43), 155.8 (C50), 168.2 (C32, C32'), 173.5 (C25, C25'), 173.6 (C25, C25'). **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für C₇₇H₁₁₃N₅O₁₀SNa: m/z 1322.8100, gef.: m/z 1322.8081.

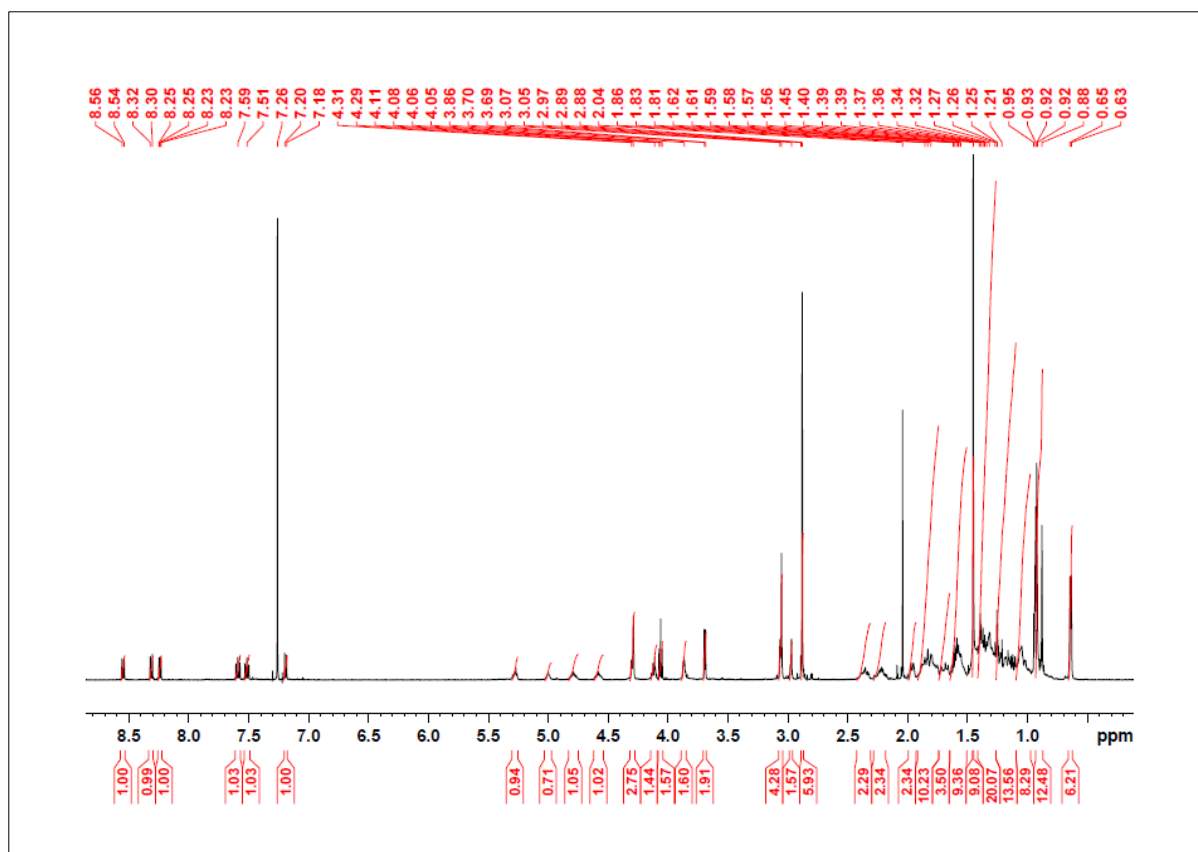


Abbildung 403: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): N-Dansyl-(glycin-lithocholsäure-N-methylpropargylamid-Dimer)-N-Boc 101.

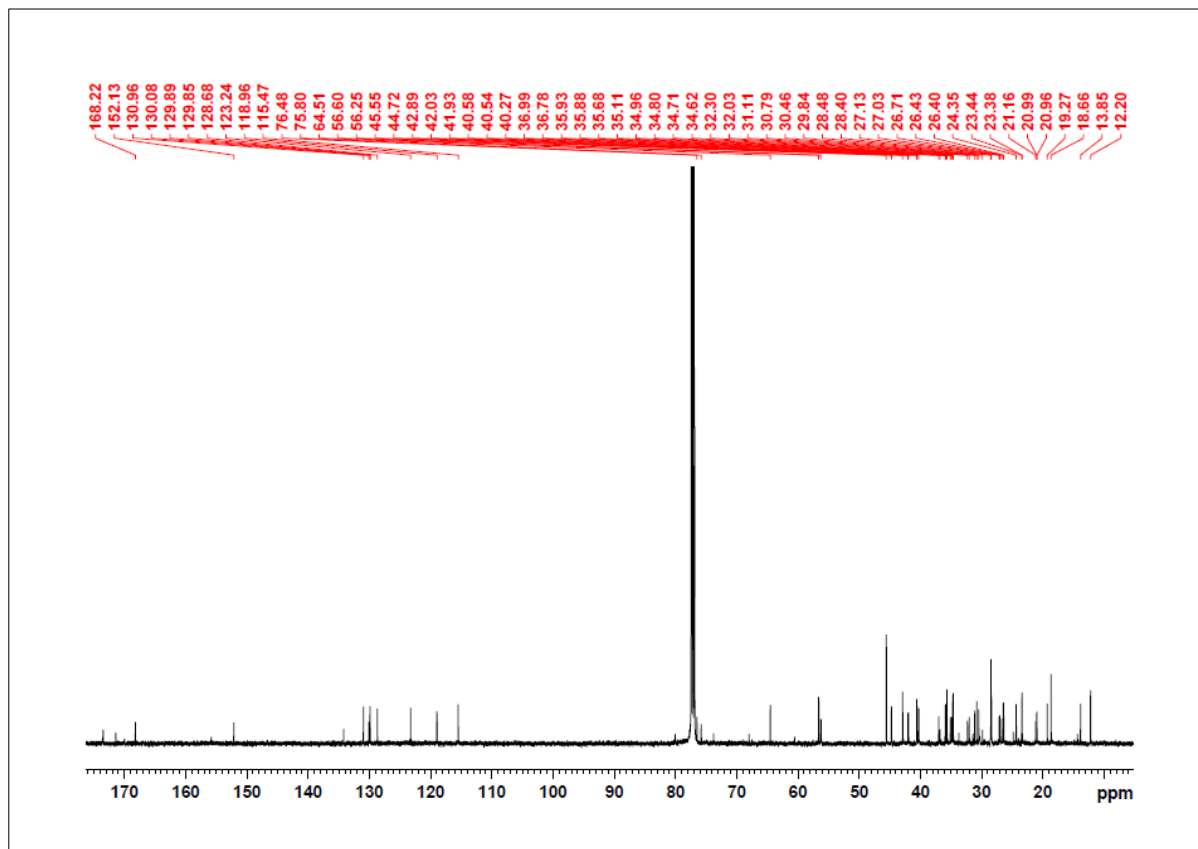
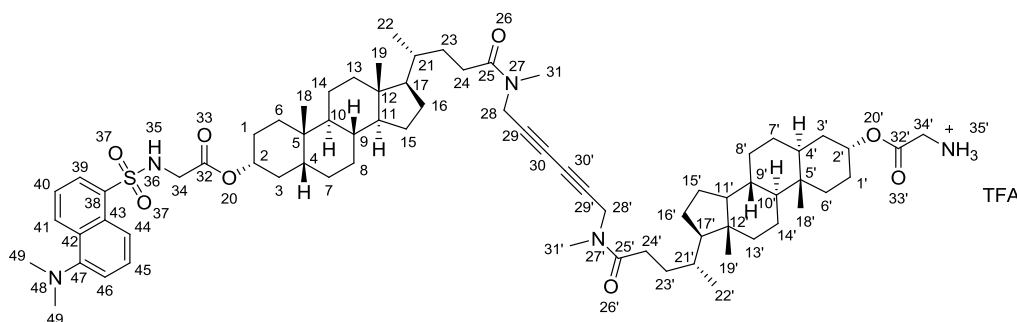


Abbildung 404: ¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃): N-Dansyl-(glycin-lithocholsäure-N-methylpropargylamid-Dimer)-N-Boc 101.

5.3.7.6 *N*-Dansyl-(glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-trifluoracetat **102****Ansatz:**

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
101 (5.3.7.5)	1321.71	1.0	0.038	0.05	
TFA					1.0
CH ₂ Cl ₂					5.0
Benzol					18.0

Durchführung:

0.05 g (0.038 mmol) *N*-Dansyl-(glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-Boc **101** wurden in 5 mL Dichlormethan gelöst und mit 1 mL Trifluoressigsäure versetzt. Die Reaktionslösung wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt und der Reaktionsfortschritt mittels DC überprüft. Die Lösung wurde mit 6 mL Benzol verdünnt und anschließend am Rotationsverdampfer auf 2 mL eingengt. Das so erhaltene Konzentrat wurde zweimal mit je 6 mL Benzol aufgenommen und wiederum eingengt, um die überschüssige Trifluoressigsäure im azeotropen Gemisch vollständig zu entfernen. Das Produkt wurde 48 h im Ölpumpenvakuum getrocknet. Es konnten 0.045 g (0.038 mmol) eines farblosen Feststoffs erhalten werden.

Analytik:

Ausbeute: 99 %. **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄ = 1:1): δ = 0.61 (s, 3H, H-19), 0.62 (s, 3H, H-19'), 0.86 (s, 6H, H-18), 0.91 (s, 6H, H-18'), 0.92 (m, 6H, H-22, H-22'), 0.89-0.93 (m, 2H, H-6, H-6'), 1.11-1.22 (m, 16H, H-7, H-7', H-8, H-8', H-11, H-11', H-13, H-13', H-14, H-14', H-15, H-15', H-16, H-16', H-17, H-17'), 1.26-1.52 (m, 16H, H-1, H-1', H-4, H-4', H-8, H-8', H-9, H-9', H-10, H-10', H-14, H-14', H-23, H-23'), 1.54-1.61 (m, 2H, H-3, H-3'), 1.64-1.73 (m, 2H, H-15, H-15'), 1.73-1.77 (m, 2H, H-1, H-1'), 1.78-1.93 (m, 10H, H-3, H-3', H-6, H-6', H-7, H-7', H-16, H-16', H-21, H-21'), 1.94-2.03 (m, 2H, H-13, H-13'), 2.14-2.27 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.30-2.41 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.89 (s, 6H, H-49), 2.93 (m, 2H, H-31, H-31'), 3.05 (m, 4H, H-31, H-31'), 3.67 (s, 4H, H-34, H-34'), 4.07 (s, 1H, H-28, H-28'), 4.23 (m, 3H, H-28, H-28'), 4.48-4.55 (m, 1H, H-2'), 4.77-4.85 (m, 1H, H-2), 7.19 (d, ³*J*_{HH} = 7.92 Hz, 2H, H-44, H-44'), 7.50 (t, ³*J*_{HH} = 7.92 Hz, 2H, H-45), 7.57 (t, ³*J*_{HH} = 7.92 Hz, 2H, H-40), 8.19 (dd, ³*J*_{HH} = 7.21 Hz, ⁵*J*_{HH} = 1.34 Hz, 2H, H-41), 8.30 (d, ³*J*_{HH} = 8.67 Hz, 2H, H-46), 8.52 (d, ³*J*_{HH} = 8.56 Hz, 2H, H-39). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄ = 1:1): δ = 11.7 (C19, C19'), 18.2 (C22, C22'), 20.7 (C14, C14'), 23.0 (C18), 23.1 (C18'), 24.1 (C15, C15'), 26.1 (C8, C8'), 26.3 (C7, C7'), 26.8 (C16), 26.9 (C16'), 28.1 (C1, C1'), 30.2/30.3 (C23, C23'), 32.3 (C24, C24'), 31.8 (C24, C24'), 31.9 (C23, C23'), 33.6 (C31, C31'), 34.4 (C5, C5'), 34.7 (C31, C31'), 34.8 (C6, C6'), 35.5 (C21, C21'), 35.7/35.8 (C9, C9'), 36.9 (C3, C3'), 40.0 (C13, C13'), 40.3 (C28, C28'), 40.4 (C10, C10'), 41.7/41.8 (C34, C34'), 42.6 (C4, C4'), 44.3 (C12, C12'), 45.3 (C49), 55.9 (C17, C17'), 56.3 (C11, C11'), 64.2 (C30, C30'), 67.6/67.7 (C30, C30'), 68.2/68.3 (C29, C29'), 76.1 (C2, C2'), 78.4 (C29, C29'), 115.3 (C44), 119.1 (C40), 123.1 (C45), 128.2 (C40), 129.3 (C41), 129.6 (C42), 130.4 (C47), 131.0 (C46), 134.5 (C38), 151.4 (C43), 168.6 (C32, C32'), 174.0 (C25, C25'), 174.2 (C25, C25'). **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für C₇₂H₁₀₅N₅O₈SNa: m/z 1222.7576, gef.: m/z 1222.7552.

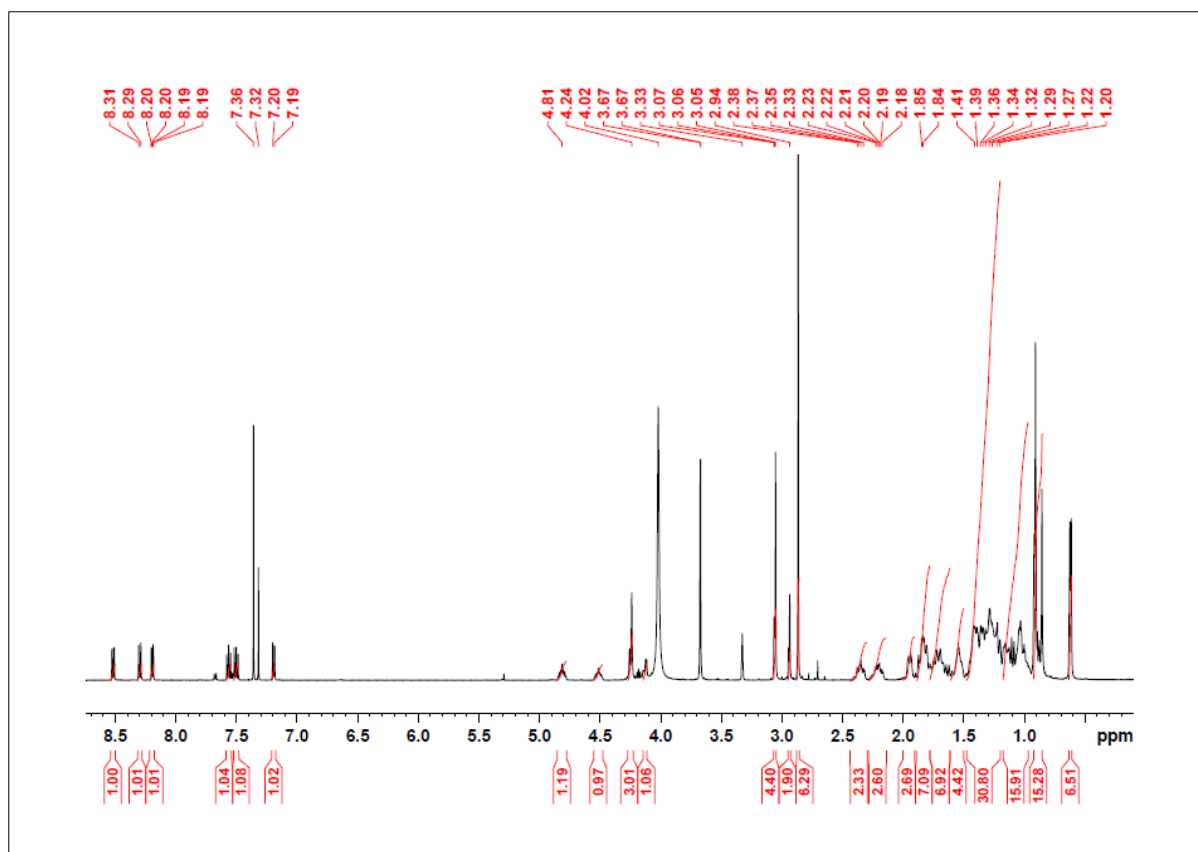


Abbildung 405: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄ = 1:1): N-Dansyl-(glycin-lithocholsäure-N-methylpropargylamid-Dimer)-trifluoracetat 102.

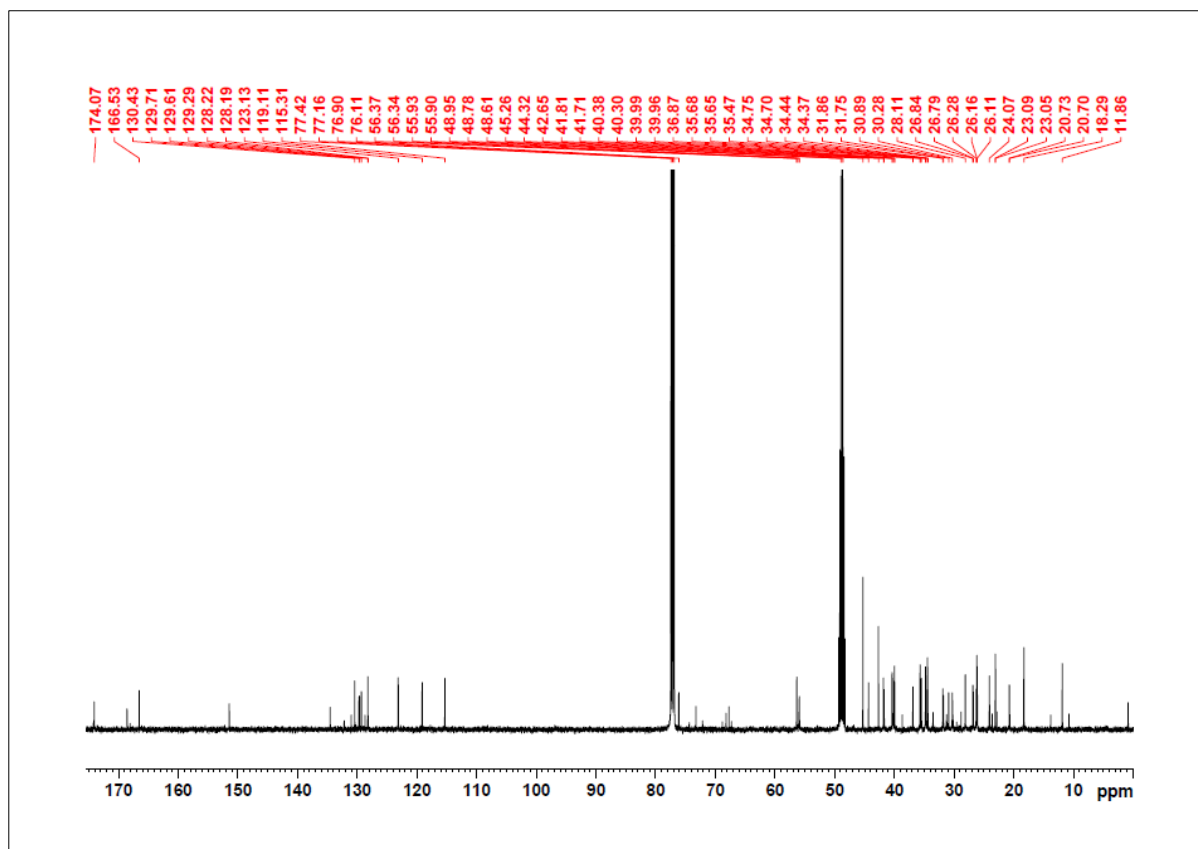
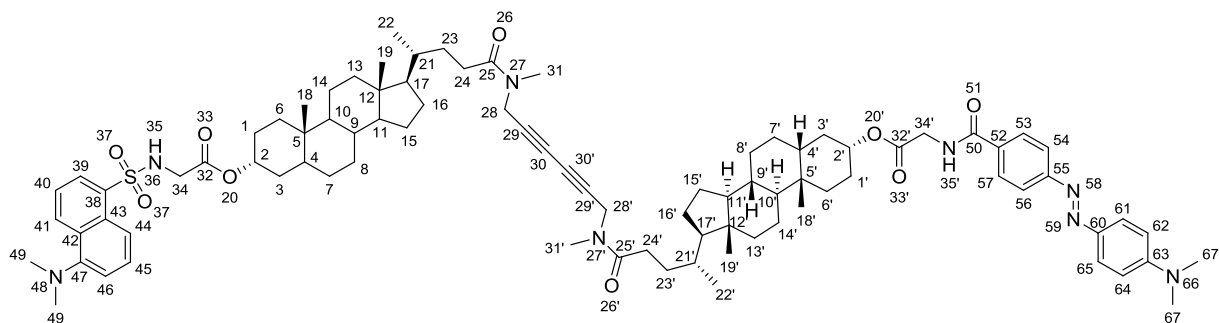


Abbildung 406: ¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄ = 1:1): N-Dansyl-(glycin-lithocholsäure-N-methylpropargylamid-Dimer)-trifluoracetat 102.

5.3.7.7 *N*-DabcyI-(glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-*N*'-Dansyl 110



Ansatz:

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
100 (5.3.3.1)	736.00	1.0	0.078	0.056	
111 (5.3.4.2)	717.42	1.1	0.084	0.060	
CuCl	99.00	10.0	0.780	0.077	
TMEDA	116.20	10.0	0.780	0.894	1.17
CH ₂ Cl ₂					15.0

Durchführung:

0.056 g *N*-DabcyI-glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid **111** (0.078 mmol, 1 eq.), 0.060 g *N*-Dansyl-glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid **100** (0.084 mmol, 1.1 eq.) und 0.077 g Kupfer(I)chlorid (0.777 mmol, 10 eq.) wurden in 15 mL Dichlormethan suspendiert. Anschließend wurden 1.17 mL *N,N,N',N'*-Tetramethylethyldiamin (0.894 g, 0.777 mmol, 10 eq.) hinzugegeben und solange gerührt, bis das Kupfer(I)chlorid vollständig in Lösung gegangen war. Die Atmosphäre über der hellgrünen Lösung wurde anschließend mit Sauerstoff gesättigt. Die entstandene tiefblaue Lösung wurde weitere 15 h bei Raumtemperatur gerührt und der Reaktionsverlauf mittels DC überprüft. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch zweimal mit je 15 mL gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt (0.086 g) wurde säulenchromatographisch gereinigt (*n*-Hexan : Ethylacetat = 1:1). Hierbei war eine vollständige Trennung von Nebenprodukten nicht möglich (*R_F* = 0.13). Durch eine weitere säulenchromatographische Reinigung (Dichlormethan : Methanol = 10:1) konnten 0.006 g (0.004 mmol) eines roten, feinkristallinen Feststoffs isoliert werden.

Analytik:

Ausbeute: 5 %. **R_F:** 0.15 (*n*-Hexan : Ethylacetat = 1:1), 0.74 (Dichlormethan : Methanol = 10:1). **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ = 0.68 (s, 6H, H-19, H-19'), 0.91-0.98 (m, 12H, H-18, H-18', H-22, H-22'), 0.99-1.05 (m, 2H, H-6, H-6'), 1.07-1.31 (m, 16H, H-7, H-7', H-8, H-8', H-11, H-11', H-13, H-13', H-14, H-14', H-15, H-15', H-16, H-16', H-17, H-17'), 1.33-1.48 (m, 16H, H-1, H-1', H-4, H-4', H-8, H-8', H-9, H-9', H-10, H-10', H-14, H-14', H-23, H-23'), 1.51-1.56 (m, 2H, H-3, H-3'), 1.57-1.63 (m, 2H, H-15, H-15'), 1.66-1.69 (m, 2H, H-1, H-1'), 1.76-1.92 (m, 10H, H-3, H-3', H-6, H-6', H-7, H-7', H-16, H-16', H-21, H-21'), 1.97-2.02 (m, 2H, H-13, H-13'), 2.09 (bs, 2H, H-20, H-20'), 2.10-2.30 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.31-2.44 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.92 (s, 6H, H-49), 3.01 (s, 2H, H-31, H-31'), 3.09 (s, 4H, H-31, H-31'), 3.11 (s, 2H, H-67, H-67), 3.15 (s, 4H, H-67, H-67), 3.73 (d, ³J_{HH} = 5.42 Hz, 2H, H-34), 4.15-4.16 (m, 1.4H, H-28, H-28'), 4.27 (d, ³J_{HH} = 5.20 Hz, 2H, H-34'), 4.33-4.35 (m, 2.6H, H-28, H-28'), 4.57-4.66 (m, 1H, H-2), 4.85-4.94 (m, 1H, H-2'), 5.30 (t, ³J_{HH} = 5.42 Hz, 1H, H-35), 6.75 (t, ³J_{HH} = 5.20 Hz, 1H, H-35'), 6.80 (d, ³J_{HH} = 9.15 Hz, 2H, H-62, H-64), 7.23 (d, ³J_{HH} = 7.49 Hz, 1H, H-46), 7.55 (dd, ³J_{HH} = 7.38 Hz, ³J_{HH} = 8.45 Hz, 1H, H-45), 7.63 (dd, ³J_{HH} = 7.71 Hz, ³J_{HH} = 8.53 Hz, 1H, H-40), 7.91-7.97 (m, 6H, H-53, H-54, H-56, H-57, H-61, H-65), 8.27 (dd, ³J_{HH} = 7.29 Hz, ⁴J_{HH} = 1.16 Hz, 1H, H-41), 8.35 (d, ³J_{HH} = 8.61 Hz, 1H, H-44), 8.58 (d, ³J_{HH} = 8.65 Hz, 1H, H-39). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, CDCl₃): δ = 12.2 (C19, C19'), 18.7 (C22, C22'), 21.0 (C14, C14'), 23.4 (C18, C18'), 24.4 (C15, C15'), 26.5 (C8, C8'), 26.6 (C7, C7'), 27.1 (C16, C16'), 28.4 (C1, C1'), 30.4/30.6 (C23, C23'), 31.1 (C24, C24'), 31.5 (C24, C24'), 32.1 (C23, C23'), 33.7 (C31, C31'), 34.7 (C5, C5'), 34.9 (C31, C31'), 35.0 (C6, C6'), 35.7 (C21, C21'), 35.9 (C9, C9'), 37.0 (C3, C3'), 40.3 (C13, C13'), 40.4 (C28, C28'), 40.6 (C10, C10'), 41.4 (C34'), 41.9 (C34), 42.9 (C4, C4'), 44.8 (C12, C12'), 45.5 (C49, C49'), 56.3 (C17, C17'), 56.6 (C11, C11'), 68.8 (C30, C30'), 69.4 (C30, C30'), 69.4 (C29, C29'), 76.5 (C2, C2'), 78.3 (C29, C29'), 111.6 (C62, C64), 115.5 (C46), 119.0 (C39), 122.4 (C54), 123.3 (C56), 123.3 (C45), 124.8 (C60), 125.6 (C61, C65), 128.1 (C53, C57), 128.7 (C55), 128.7 (C40), 129.9 (C41), 129.9 (C42), 130.0 (C43), 131.1 (C43), 131.2 (C52), 133.9 (C63), 134.2 (C38), 152.9 (C47), 166.6 (C50), 168.2 (C32), 169.8 (C32'), 173.5 (C25, C25'), 173.6 (C25, C25'). **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für C₈₇H₁₁₉N₈O₉SN_a: m/z 737.4354, gef.: m/z 737.4344; ber. für C₈₇H₁₁₈N₈O₉SN_{a2}: m/z 748.4263, gef.: m/z 748.4293.

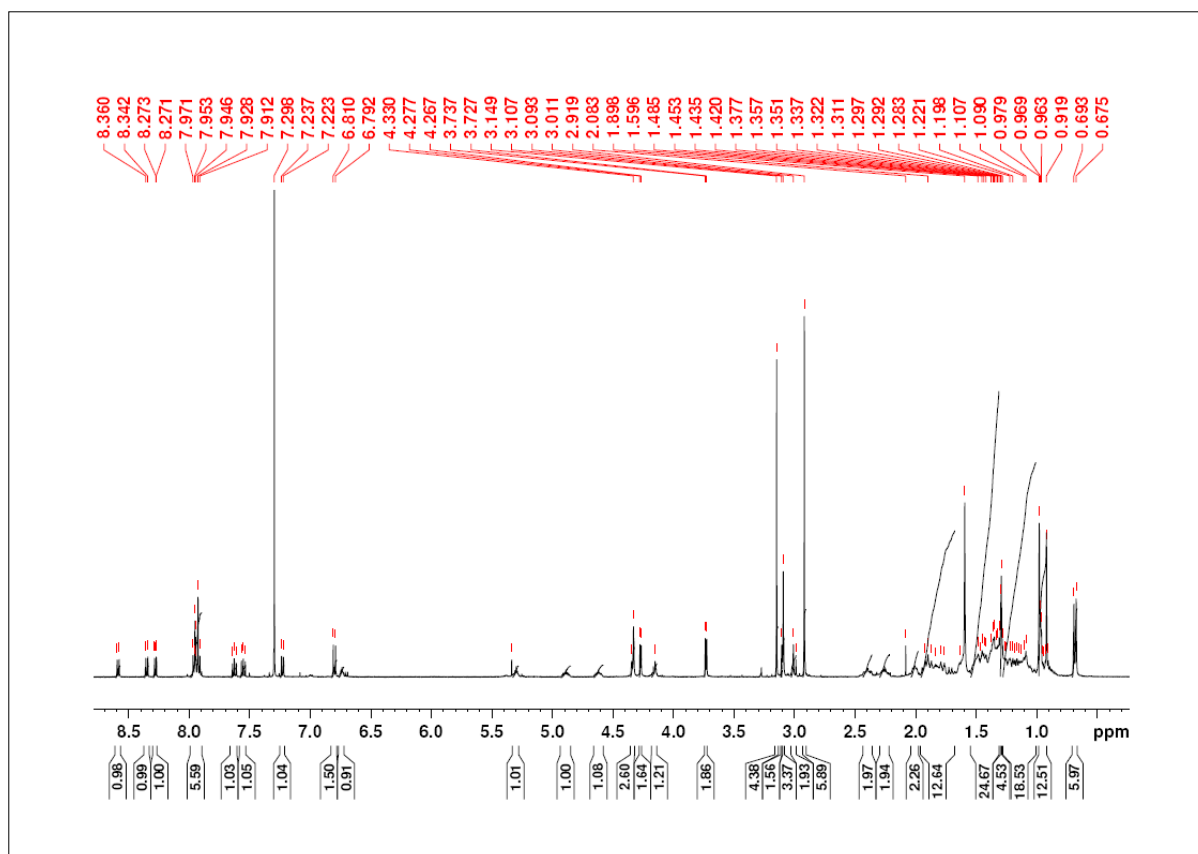


Abbildung 407: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): N-Dabcyl-(glycin-lithocholsäure-N-methylpropargylamid-Dimer)-N'-Dansyl 110.

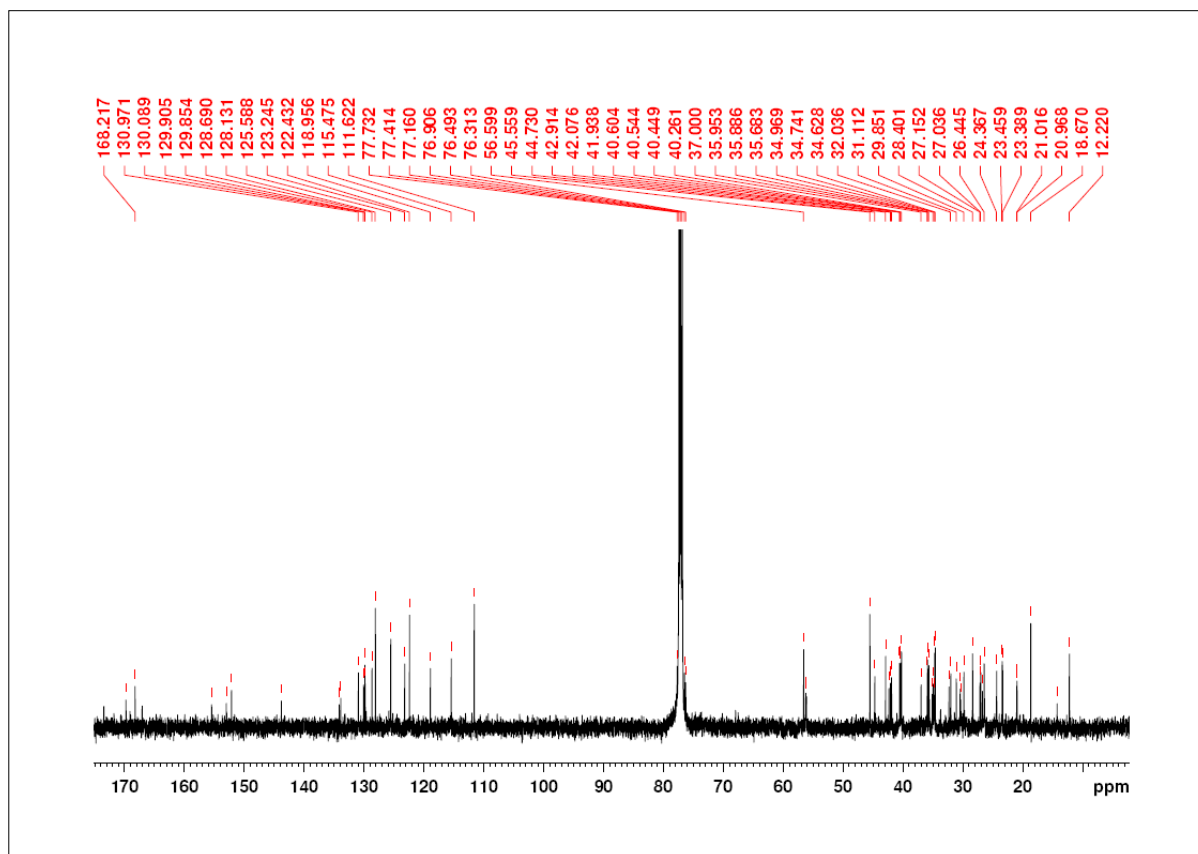
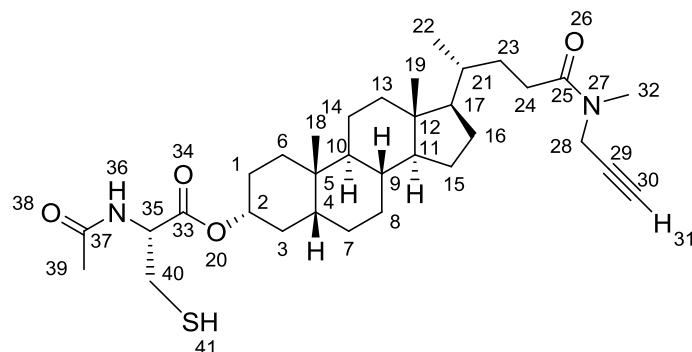


Abbildung 408: ¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃): N-Dabcyl-(glycin-lithocholsäure-N-methylpropargylamid-Dimer)-N'-Dansyl 110.

5.3.8 Synthese des Rezeptors 138 mit Thiol-Funktion

5.3.8.1 *N*-Acetyl-cystein-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid 141



Ansatz:

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
140 (5.3.1.4)	815.16	1.0	0.061	0.05	
Triisopropylsilan	158.36	2.0	0.123	0.02	0.025
TFA					1.0
CH ₂ Cl ₂					5.0
Benzol					18.0

Durchführung:

0.05 g *N*-Acetyl-cystein-(*S*-trityl)-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid **140** (0.061 mmol, 1 eq) wurden in einem Gemisch aus 5 mL Dichlormethan und 1 mL Trifluoressigsäure gelöst und 0.025 mL Triisopropylsilan (0.123 mmol, 2 eq) zugegeben. Dabei trat eine sofortige Gelbfärbung durch das Triphenylkation ein, die nach 10 min wieder verschwand. Die Reaktionslösung wurde 4 h bei Raumtemperatur gerührt und das Ende der Reaktion mittels DC überprüft. Die Lösung wurde mit 6 mL Benzol verdünnt und anschließend am Rotationsverdampfer auf 2 mL eingengt. Das so erhaltene Konzentrat wurde zweimal mit je 6 mL Benzol aufgenommen und wiederum eingengt, um die überschüssige Trifluoressigsäure im azeotropen Gemisch vollständig zu entfernen. Das Produkt wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet und anschließend säulenchromatographisch gereinigt (*n*-Hexan : Ethylacetat = 1:1, nach Abtrennung des Triphenylmethans und Spuren des Edukts: *n*-Hexan : Ethylacetat = 1:2). Es konnten 0.033 g (0.058 mmol) eines farblosen, feinkristallinen Feststoffs erhalten werden.

Analytik:

Ausbeute: 95 %. **R_F:** 0.16 (*n*-Hexan : Ethylacetat = 1:1). **¹H-NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ = 0.64 (s, 3H, H-19), 0.92 (s, 3H, H-18), 0.93 (d, $^3J_{HH}$ = 6.29 Hz, 3H, H-22), 0.93-1.00 (m, 1H, H-6), 1.02-1.24 (m, 8H, H-7, H-8, H-11, H-13, H-14, H-15, H-16, H-17), 1.26-1.44 (m, 8H, H-1, H-4, H-8, H-9, H-10, H-14, H-23), 1.46-1.50 (m, 1H, H-3), 1.52-1.56 (m, 1H, H-15), 1.61-1.64 (m, 1H, H-1), 1.70-1.88 (m, 5H, H-3, H-6, H-7, H-16, H-21), 1.91-1.95 (m, 1H, H-13), 2.05 (s, 3H, H-39), 2.17 (t, $^4J_{HH}$ = 2.04 Hz, 0.7H, H-31), 2.13-2.30 (m, 1H, H-24), 2.36 (t, $^4J_{HH}$ = 2.04 Hz, 0.3H, H-31), 2.30-2.43 (m, 1H, H-24), 2.97 (s, 1H, H-32), 3.01 (d, $^3J_{HH}$ = 4.08 Hz, 1H, H-40), 3.02 (d, $^3J_{HH}$ = 4.08 Hz, 1H, H-40), 3.06 (s, 2H, H-32), 4.03 (d, $^4J_{HH}$ = 2.04 Hz, 0.6H, H-28), 4.21 (d, $^4J_{HH}$ = 2.04 Hz, 1.3H, H-28), 4.76-4.90 (m, 2H, H-2, H-35), 6.36 (d, $^3J_{HH}$ = 6.87 Hz, 1H, H-36). **¹³C-NMR** (75.4 MHz, CDCl₃): δ = 12.1 (C19), 18.5 (C22), 20.9 (C14), 23.2 (C39), 23.3 (C18), 24.2 (C15), 26.3 (C8), 26.7 (C7), 27.0 (C16), 28.3 (C40), 30.4 (C24), 30.1 (C1), 31.2 (C24), 32.2 (C23), 32.3 (C23), 33.3 (C32), 34.4 (C32), 34.7 (C6), 34.9 (C21), 35.1 (C5), 35.5 (C9), 35.8 (C28), 36.2 (C3), 39.5 (C28), 40.1 (C13), 40.5 (C10), 41.9 (C4), 42.8 (C12), 53.6 (C35), 56.1 (C17), 56.5 (C11), 71.6 (C30), 72.7 (C30), 76.5 (C2), 78.0 (C29), 79.1 (C29), 169.6 (C37), 169.8 (C33), 173.3 (C25). **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für C₃₃H₅₃N₂O₄S: m/z 573.3721, gef.: m/z 573.3819; ber. für C₃₃H₅₂N₂O₄SNa: m/z 595.3540, gef.: m/z 595.3641.

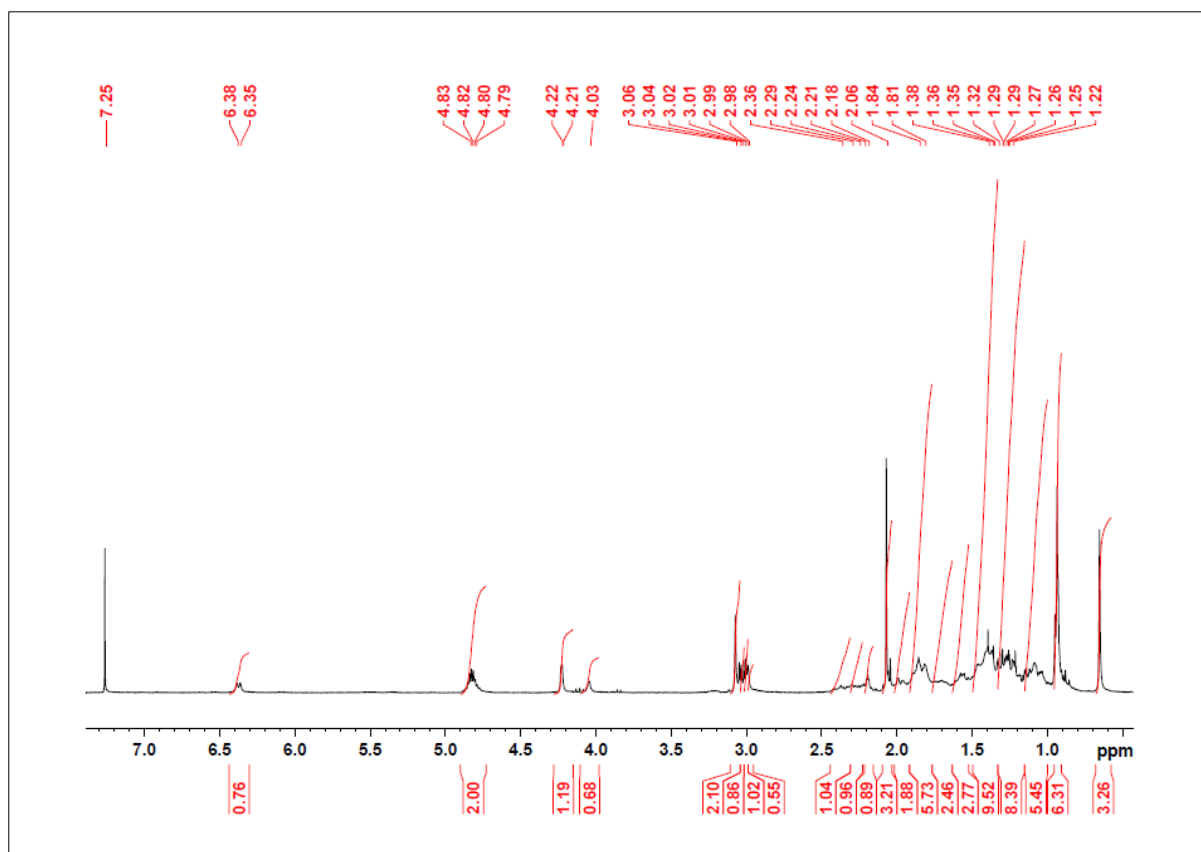


Abbildung 409: ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): *N*-Acetyl-cystein-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid 141.

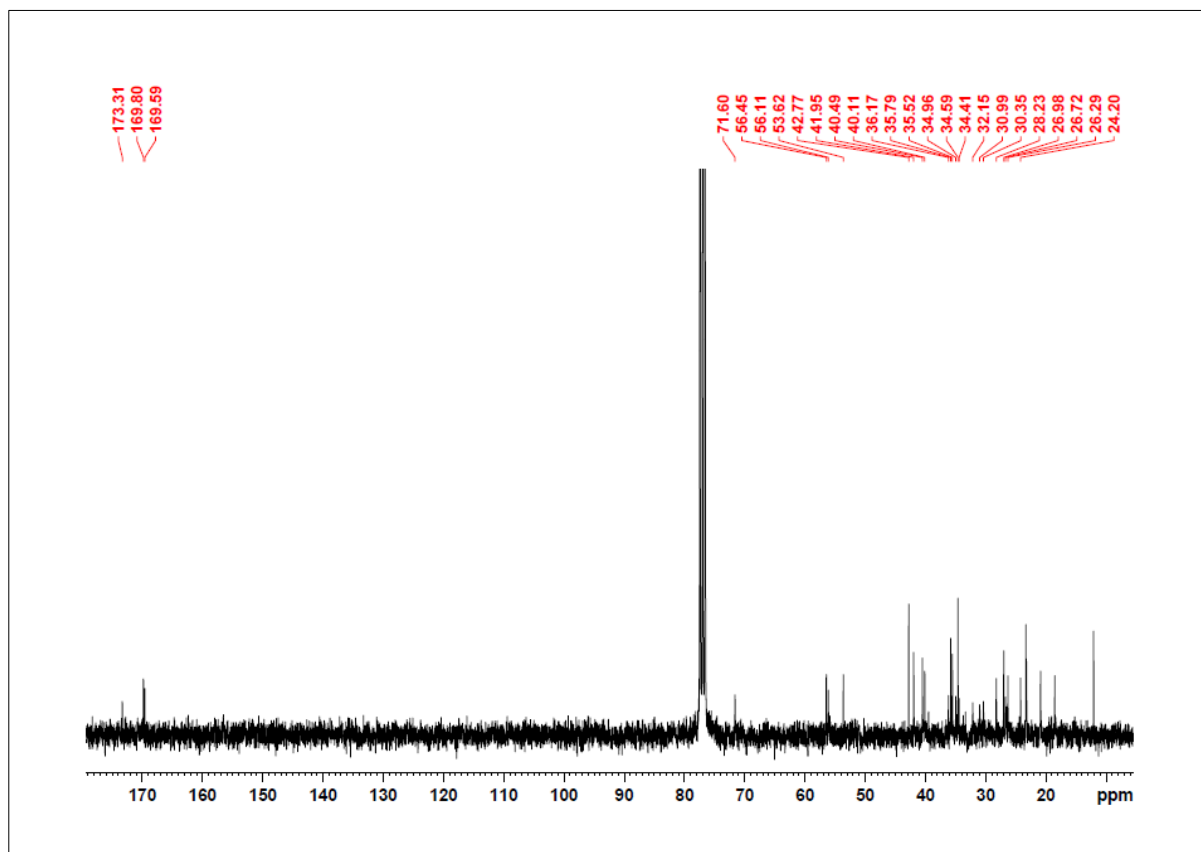
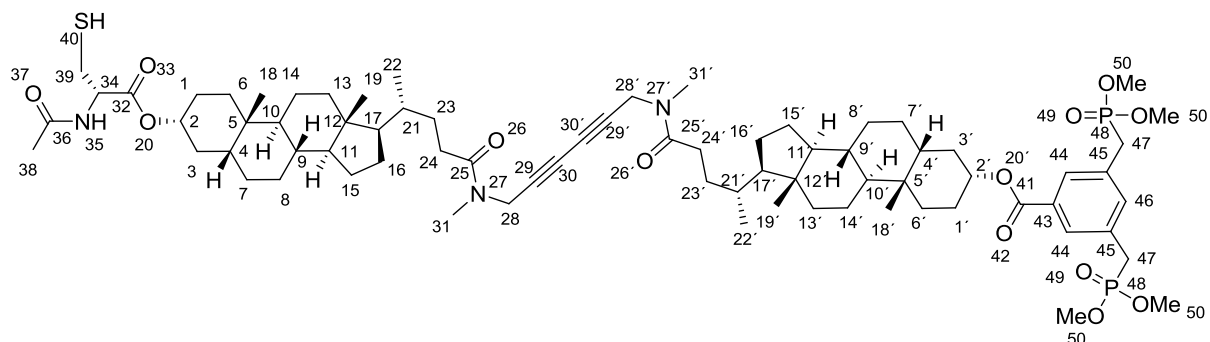


Abbildung 410: ¹³C-NMR (75.4 MHz, CDCl₃): *N*-Acetyl-cystein-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid 141.

5.3.8.2 *N*-Acetyl-cystein-(lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-BP 144



Ansatz:

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
143 (5.3.1.11)	1588.02	1.0	0.032	0.05	
Triisopropylsilan	158.36	2.0	0.063	0.01	0.013
TFA					1.0
CH ₂ Cl ₂					5.0
Benzol					18.0

Durchführung:

0.05 g *N*-Acetyl-cystein-(*S*-trityl)-(lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-BP **143** (0.032 mmol, 1 eq) wurden in einem Gemisch aus 5 mL Dichlormethan und 1 mL Trifluoressigsäure gelöst und 0.013 mL Triisopropylsilan (0.063 mmol, 2 eq) zugegeben. Dabei trat eine sofortige Gelbfärbung durch das Triphenylkation ein, die nach 10 min wieder verschwand. Die Reaktionslösung wurde 4 h bei Raumtemperatur gerührt und das Ende der Reaktion mittels DC überprüft. Die Lösung wurde mit 6 mL Benzol verdünnt und anschließend am Rotationsverdampfer auf 2 mL eingengt. Das so erhaltene Konzentrat wurde zweimal mit je 6 mL Benzol aufgenommen und wiederum eingengt, um die überschüssige Trifluoressigsäure im azeotropen Gemisch vollständig zu entfernen. Das Produkt wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet und anschließend säulenchromatographisch gereinigt (Dichlormethan : Aceton = 2:1). Es konnten 0.026 g (0.019 mmol) eines farblosen, feinkristallinen Feststoffs erhalten werden.

Analytik:

Ausbeute: 61 %. **R_F:** 0.5 (Dichlormethan : Methanol = 19:1). **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ = 0.65 (s, 3H, H-19'), 0.66 (s, 3H, H-19), 0.93 (s, 3H, H-18), 0.95 (d, $^3J_{HH}$ = 6.15 Hz, 6H, H-22, H-22'), 0.96 (s, 3H, H-18'), 0.97-1.05 (m, 2H, H-6, H-6'), 1.06-1.28 (m, 16H, H-7, H-7', H-8, H-8', H-11, H-11', H-13, H-13', H-14, H-14', H-15, H-15', H-16, H-16', H-17, H-17'), 1.31-1.50 (m, 16H, H-1, H-1', H-4, H-4', H-8, H-8', H-9, H-9', H-10, H-10', H-14, H-14', H-23, H-23'), 1.50-1.56 (m, 2H, H-3, H-3'), 1.56-1.60 (m, 2H, H-15, H-15'), 1.65-1.70 (m, 2H, H-1, H-1'), 1.74-1.93 (m, 10H, H-3, H-3', H-6, H-6', H-7, H-7', H-16, H-16', H-21, H-21'), 1.95-1.99 (m, 2H, H-13, H-13'), 1.98 (s, 3H, H-38), 2.19-2.28 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.31-2.44 (m, 2H, H-24, H-24'), 3.01 (m, 1H, H-39), 2.97 (s, 2H, H-31, H-31'), 3.06 (s, 4H, H-31, H-31'), 3.21 (d, $^2J_{PH}$ = 21.8 Hz, 4H, H-47), 3.70 (d, $^2J_{PH}$ = 10.9 Hz, 12H, H-50), 4.12 (m, 1.4H, H-28, H-28'), 4.30 (m, 2.6H, H-28, H-28'), 4.74-4.78 (m, 1H, H-34), 4.77-4.86 (m, 1H, H-2), 4.91-4.99 (m, 1H, H-2'), 6.38 (d, $^3J_{HH}$ = 7.21 Hz, 1H, H-35), 7.47 (bs, 1H, H-46), 7.84 (bs, 2H, H-44). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, CDCl₃): δ = 12.2 (C19, C19'), 18.7 (C22, C22'), 21.1 (C14, C14'), 23.2 (C38), 23.4 (C18'), 23.5 (C18), 24.4 (C15, C15'), 26.5 (C8, C8'), 26.8 (C7, C7'), 27.1 (C16), 27.2 (C16'), 28.4 (C24, C24'), 30.3 (C1, C1'), 30.4 (C24, C24'), 31.1 (C23, C23'), 32.2 (d, $^1J_{PC}$ = 115.3 Hz, C47), 33.1 (C31, C31'), 33.2 (C31, C31'), 34.3 (C39), 34.7 (C6, C6'), 34.8 (C21, C21'), 35.2 (C5, C5'), 35.6 (C9, C9'), 35.9 (C28), 36.0 (C28'), 37.0 (C3, C3'), 40.2 (C28, C28'), 40.3 (C13, C13'), 40.6 (C10, C10'), 42.1 (C4, C4'), 42.9 (C12, C12'), 53.2 (d, $^2J_{PC}$ = 6.3 Hz, C50), 53.9 (C34), 56.2 (C17, C17'), 56.6 (C11, C11'), 68.0 (C30, C30'), 69.7 (C30, C30'), 73.8 (C29, C29'), 75.5 (C2, C2'), 76.6 (C29, C29'), 129.7 (C44), 132.0 (C43), 132.1 (C45), 135.3 (C46), 165.6 (C41), 169.6 (C36), 170.1 (C32), 173.6 (C25, C25'). **³¹P-NMR** (121.5 MHz, CDCl₃): δ = 28.1. **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für C₇₄H₁₁₃N₃O₁₃P₂SNa: m/z 1368.7362, gef.: m/z 1368.7432.

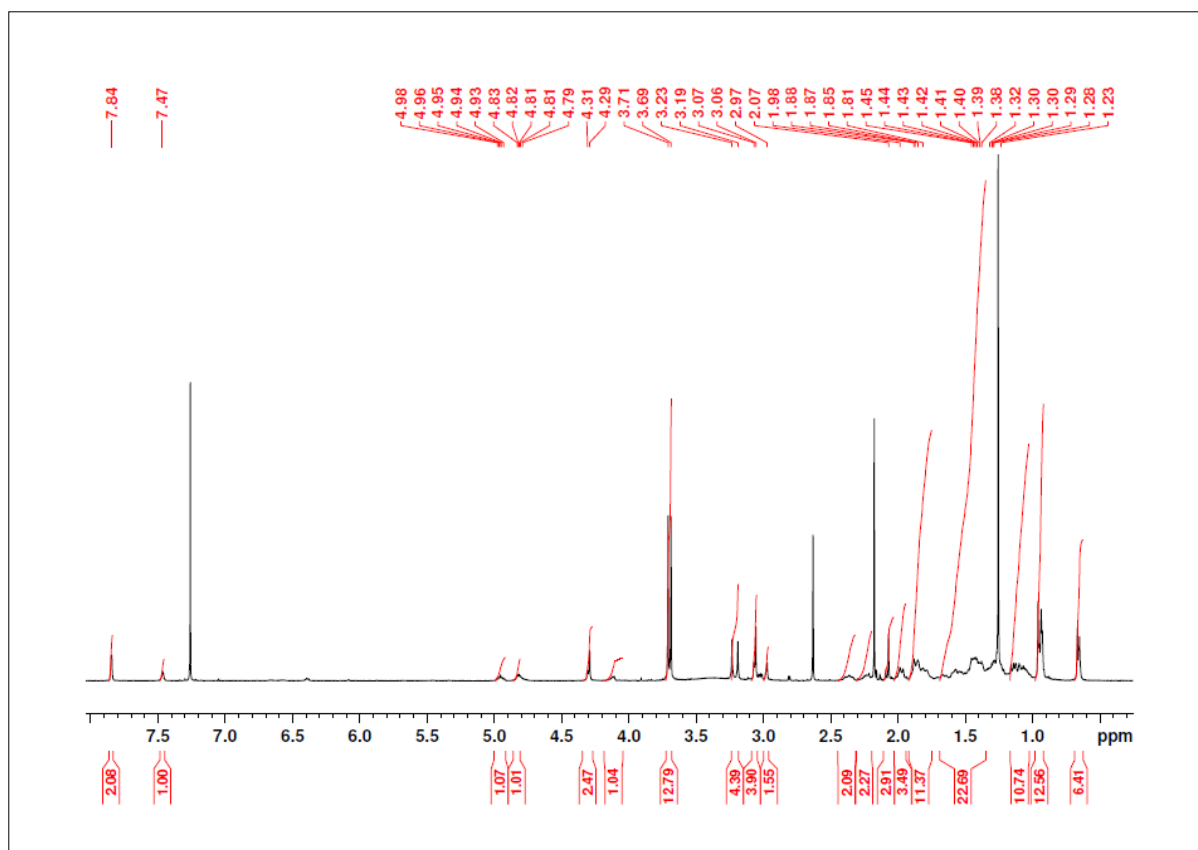


Abbildung 411: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): N-Acetyl-cystein-(lithocholsäure-N-methylpropargylamid-Dimer)-BP 144.

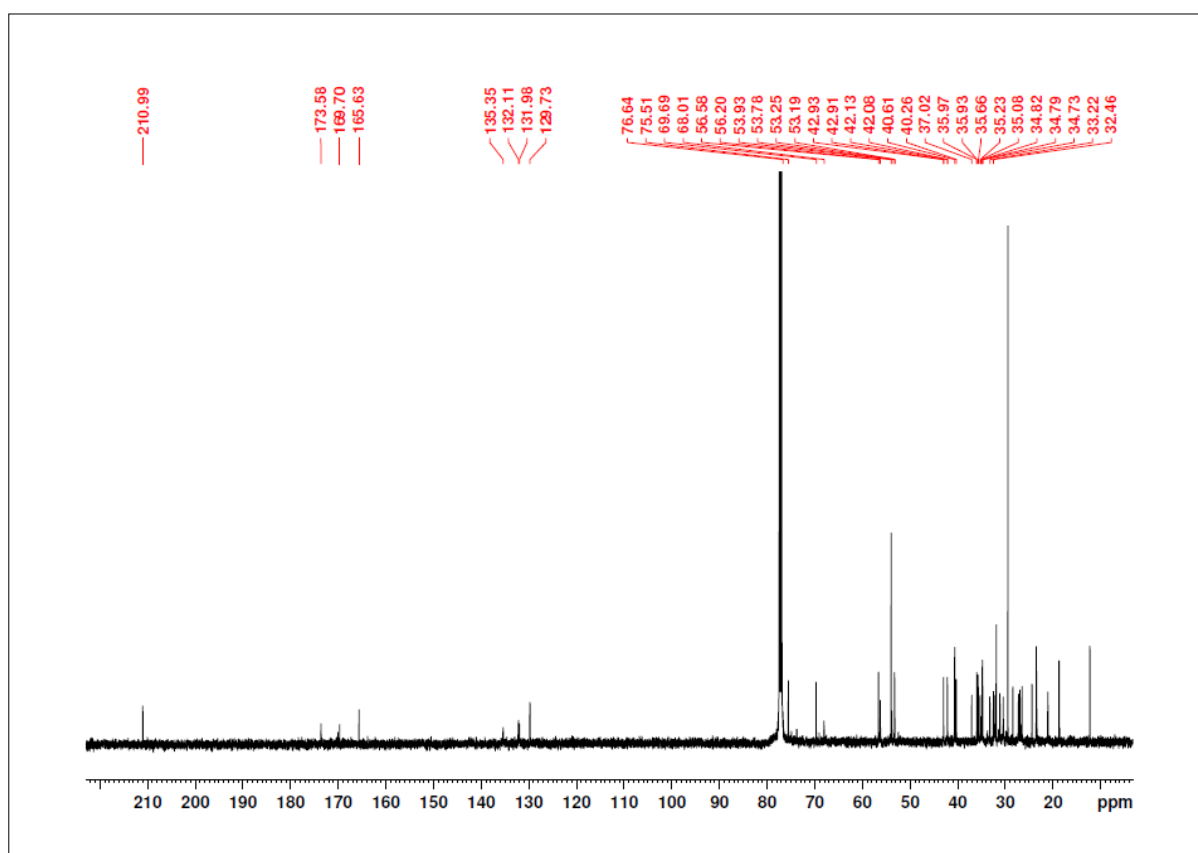
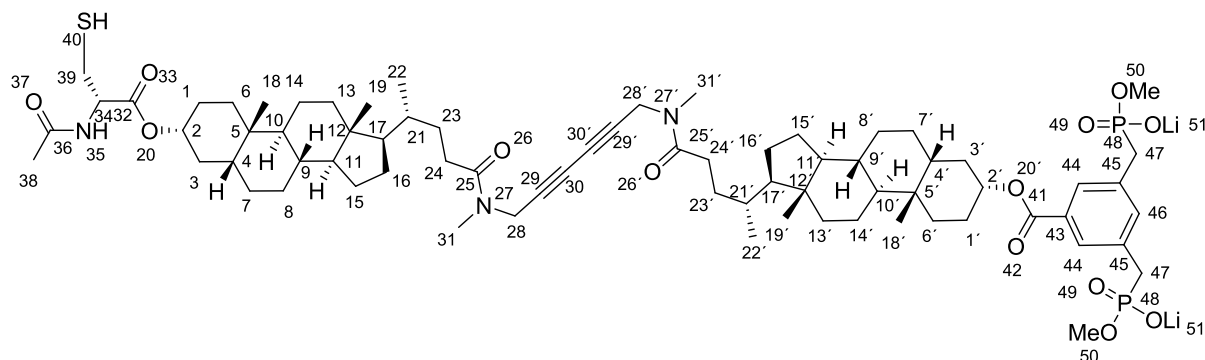


Abbildung 412: ¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃): N-Acetyl-cystein-(lithocholsäure-N-methylpropargylamid-Dimer)-BP 144.

5.3.8.3 *N*-Acetyl-cystein-(lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-BP(OLi)₂ 138Ansatz:

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
144 (5.3.1.2)	1346.71	1.0	0.009	0.012	
LiBr	86.84	2.2	0.022	0.0025	
Acetonitril					10.0

Durchführung:

0.012 g *N*-Acetyl-cystein-(lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-BP **144** (0.009 mmol, 1 eq.) wurden in 10 mL Acetonitril gelöst und mit 0.0025 g wasserfreiem LiBr (0.022 mmol, 2.2 eq.) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 48 h unter Rückfluss erhitzt. Dabei fiel das Produkt als farbloser Feststoff aus. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels DC überprüft. Nach vollständiger Umsetzung des Edukts wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur gekühlt und der Feststoff samt Reaktionslösung in ein Zentrifugenglas überführt. Der erhaltene Feststoff wurde abgetrennt und vier Mal mit je 10 mL Acetonitril gewaschen. Das farblose Produkt (0.011 g, 0.008 mmol) wurde gründlich im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Analytik:

Ausbeute: 98 %. **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄ = 1:1): δ = 0.51 (s, 3H, H-19'), 0.52 (s, 3H, H-19), 0.78 (s, 3H, H-18), 0.80 (d, ³*J*_{HH} = 6.25 Hz, 6H, H-22, H-22'), 0.81 (s, 3H, H-18'), 0.86-0.94 (m, 2H, H-6, H-6'), 0.95-1.17 (m, 16H, H-7, H-7', H-8, H-8', H-11, H-11', H-13, H-13', H-14, H-14', H-15, H-15', H-16, H-16', H-17, H-17'), 1.20-1.39 (m, 16H, H-1, H-1', H-4, H-4', H-8, H-8', H-9, H-9', H-10, H-10', H-14, H-14', H-23, H-23'), 1.39-1.45 (m, 2H, H-3, H-3'), 1.45-1.49 (m, 2H, H-15, H-15'), 1.54-1.59 (m, 2H, H-1, H-1'), 1.65-1.82 (m, 10H, H-3, H-3', H-6, H-6', H-7, H-7', H-16, H-16', H-21, H-21'), 1.83 (s, 3H, H-38), 1.84-1.90 (m, 2H, H-13, H-13'), 2.02-2.13 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.19-2.30 (m, 2H, H-24, H-24'), 3.01 (m, 1H, H-39), 2.85 (d, ²*J*_{PH} = 21.8 Hz, 4H, H-47), 2.89 (s, 2H, H-31, H-31'), 2.94 (s, 4H, H-31, H-31'), 3.48 (d, ²*J*_{PH} = 10.9 Hz, 6H, H-50), 3.99 (m, 1H, H-39), 4.01-4.03 (m, 1H, H-34), 4.04 (m, 1.4H, H-28, H-28'), 4.12 (m, 2.6H, H-28, H-28'), 4.57-4.66 (m, 1H, H-2), 4.73-4.82 (m, 1H, H-2'), 7.40 (bs, 1H, H-46), 7.60 (bs, 2H, H-44). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄ = 1:1): δ = 12.1 (C19, C19'), 18.3/18.5 (C22, C22'), 21.0 (C14, C14'), 23.3 (C38), 23.4 (C18'), 24.5 (C15, C15'), 26.5 (C8, C8'), 26.8 (C7, C7'), 27.2 (C16, C16'), 28.4 (C24, C24'), 29.8 (C1, C1'), 30.5 (C24, C24'), 31.1 (C23, C23'), 32.3 (d, ¹*J*_{PC} = 115.3 Hz, C47), 33.1 (C31, C31'), 33.7 (C31, C31'), 34.7 (C6, C6'), 34.8 (C21, C21'), 35.0 (C5, C5'), 35.1 (C9, C9'), 35.2 (C28), 35.6 (C39), 35.9 (C28'), 37.1 (C3, C3'), 40.2 (C28, C28'), 40.6 (C13, C13'), 40.7 (C10, C10'), 42.1 (C4, C4'), 42.9 (C12, C12'), 51.8 (d, ²*J*_{PC} = 6.3 Hz, C50), 52.2 (C34), 56.1 (C17, C17'), 56.6 (C11, C11'), 67.9 (C30, C30'), 69.3 (C30, C30'), 73.6 (C29, C29'), 75.5 (C2, C2'), 76.6 (C29, C29'), 128.8 (C44), 132.8 (C43), 132.9 (C45), 134.5 (C46), 165.4 (C41), 169.3 (C36), 170.3 (C32), 173.6 (C25, C25'). **³¹P-NMR** (121.5 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄ = 1:1): δ = 22.0. **HRMS** (ESI neg., MeOH): ber. für C₇₂H₁₀₆N₃O₁₃P₂S: m/z 657.3455, gef.: m/z 657.3521.

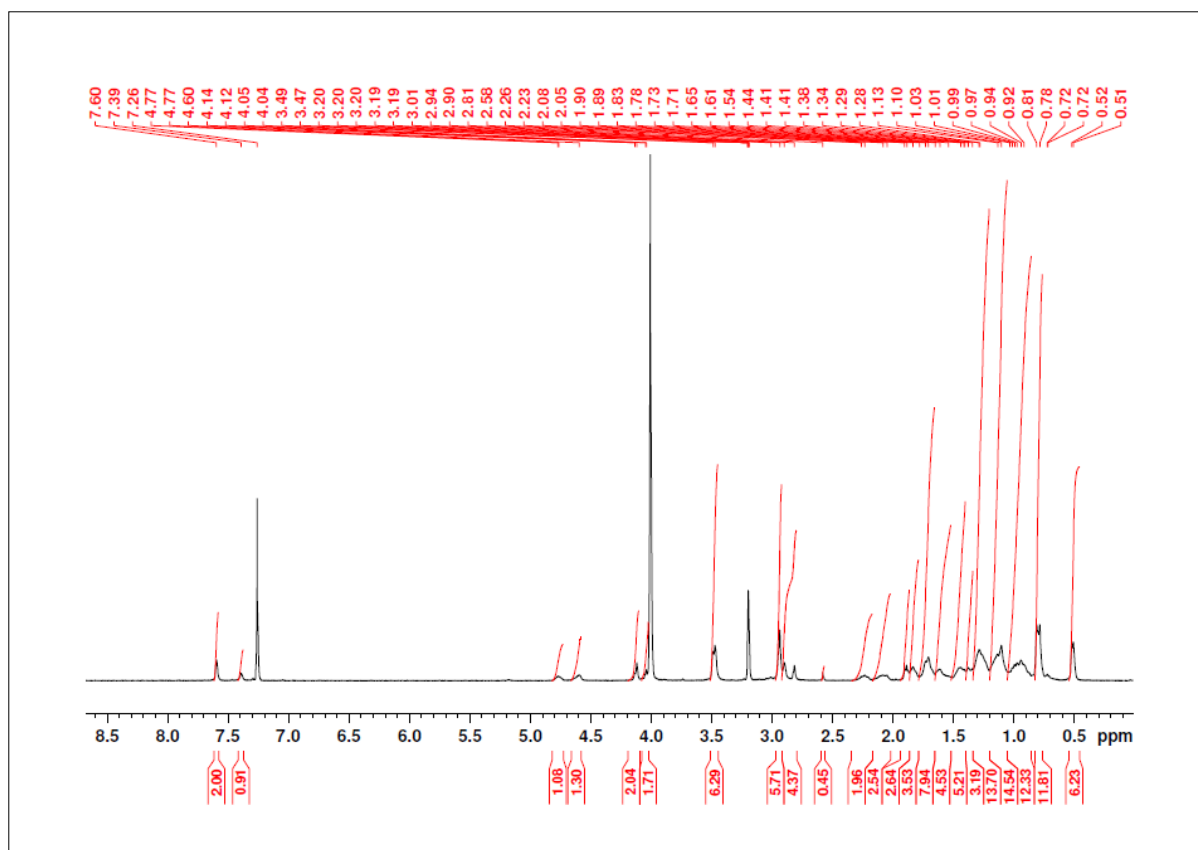


Abbildung 413: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄ = 1:1): *N*-Acetyl-cystein-(lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-BP(OLi)₂ 138.

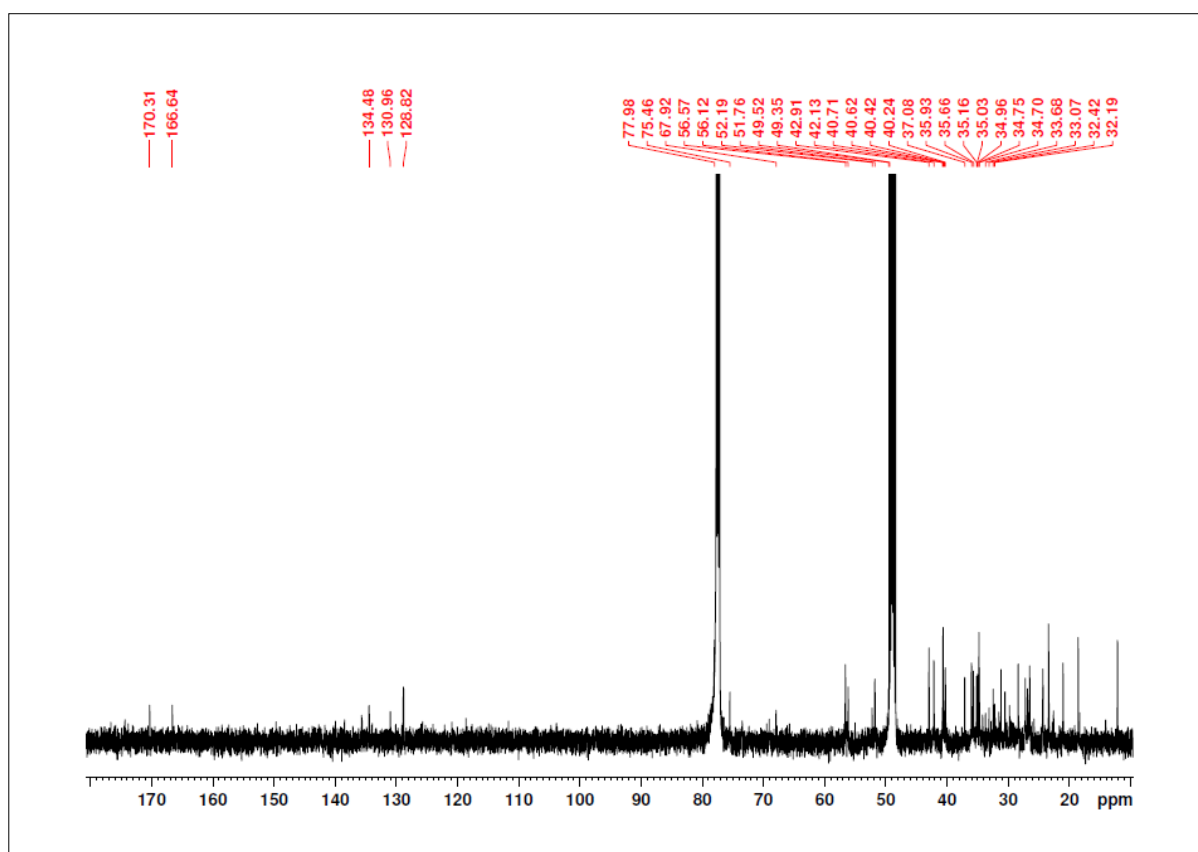
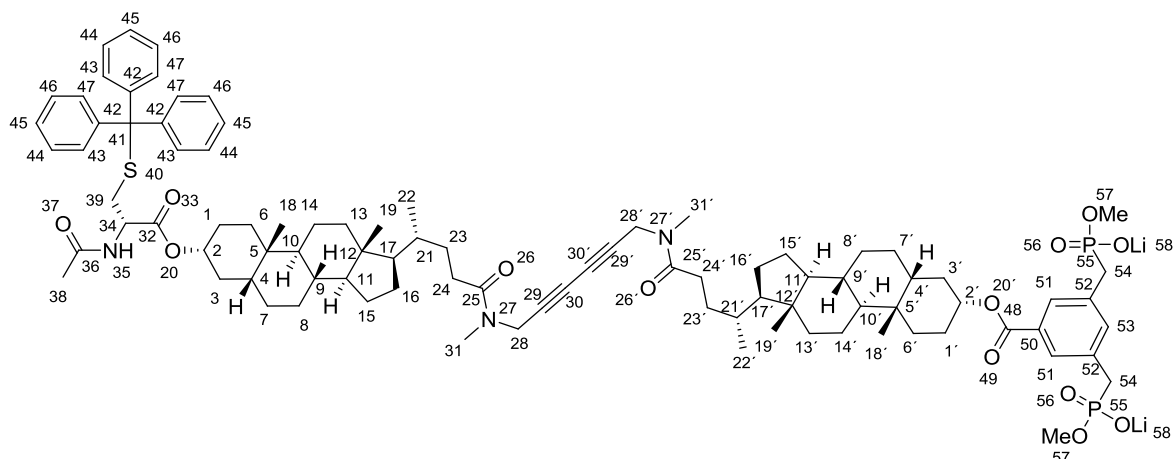


Abbildung 414: ¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄ = 1:1): *N*-Acetyl-cystein-(lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-BP(OLi)₂ 138.

5.3.9 Synthese des Rezeptors 139 mit Disulfid-Funktion

5.3.9.1 *N*-Acetyl-cystein-(*S*-trityl)-(lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-BP(OLi)₂ 145



Ansatz:

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
143 (5.3.1.11)	1589.03	1.0	0.046	0.073	
LiBr	86.84	2.5	0.115	0.011	
Acetonitril					10.0

Durchführung:

0.073 g *N*-Acetyl-cystein-(*S*-trityl)-(lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-BP **143** (0.046 mmol, 1 eq.) wurden in 10 mL Acetonitril gelöst und mit 0.011 g wasserfreiem LiBr (0.115 mmol, 2.5 eq.) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 48 h unter Rückfluss erhitzt. Dabei fiel das Produkt als gelber Feststoff aus. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels DC überprüft. Nach vollständiger Umsetzung des Edukts wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur gekühlt und der Feststoff samt Reaktionslösung in ein Zentrifugenglas überführt. Der erhaltene Feststoff wurde abgetrennt und vier Mal mit je 10 mL Acetonitril gewaschen. Das gelbe Produkt (0.071 g, 0.045 mmol) wurde gründlich im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Analytik:

Ausbeute: 99 %. **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄ = 1:1): δ = 0.66 (s, 6H, H-19, H-19'), 0.92 (d, ³*J*_{HH} = 6.15 Hz, 6H, H-22, H-22'), 0.95 (s, 6H, H-18, H-18'), 0.97-1.04 (m, 2H, H-6, H-6'), 1.06-1.28 (m, 16H, H-7, H-7', H-8, H-8', H-11, H-11', H-13, H-13', H-14, H-14', H-15, H-15', H-16, H-16', H-17, H-17'), 1.30-1.48 (m, 16H, H-1, H-1', H-4, H-4', H-8, H-8', H-9, H-9', H-10, H-10', H-14, H-14', H-23, H-23'), 1.50-1.54 (m, 2H, H-3, H-3'), 1.56-1.60 (m, 2H, H-15, H-15'), 1.65-1.68 (m, 2H, H-1, H-1'), 1.74-1.92 (m, 10H, H-3, H-3', H-6, H-6', H-7, H-7', H-16, H-16', H-21, H-21'), 1.95-1.99 (m, 2H, H-13, H-13'), 1.95 (s, 3H, H-38), 2.21-2.27 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.35-2.42 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.45 (dd, ²*J*_{HH} = 12.41 Hz, ³*J*_{HH} = 4.57 Hz, 1H, H-39), 2.61 (ddd, ²*J*_{HH} = 12.41 Hz, ³*J*_{HH} = 4.57 Hz, ³*J*_{HH} = 5.53 Hz, 1H, H-39), 2.95 (s, 2H, H-31, H-31'), 2.97 (d, ²*J*_{PH} = 21.8 Hz, 4H, H-54), 3.09 (s, 4H, H-31, H-31'), 3.51 (d, ²*J*_{PH} = 10.8 Hz, 6H, H-57), 4.17 (m, 1.4H, H-28, H-28'), 4.26 (m, 2.6H, H-28, H-28'), 4.34 (ddd, ³*J*_{HH} = 5.53 Hz, ³*J*_{HH} = 4.43 Hz, ³*J*_{HH} = 7.61 Hz, 1H, H-34), 4.60-4.67 (m, 1H, H-2), 4.88-4.91 (m, 1H, H-2'), 7.20 (t, ³*J*_{HH} = 7.51 Hz, 3H, H-45), 7.27 (t, ³*J*_{HH} = 7.51 Hz, 6H, H-44, H-46), 7.36 (d, ³*J*_{HH} = 8.05 Hz, 6H, H-43, H-47), 7.54 (bs, 1H, H-53), 7.73 (bs, 2H, H-51). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄ = 1:1): δ = 12.6 (C19, C19'), 18.9 (C22, C22'), 21.5 (C14'), 22.7 (C14), 23.7 (C38), 23.8 (C18, C18'), 24.9 (C15, C15'), 27.0 (C8'), 27.4 (C8), 27.6 (C7, C7'), 27.7 (C16, C16'), 28.9 (C24, C24'), 30.7 (C1, C1'), 30.9 (C24, C24'), 31.0 (C23, C23'), 32.8 (d, ¹*J*_{PC} = 115.3 Hz, C54), 32.7 (C31, C31'), 33.1 (C31, C31'), 34.2 (C6, C6'), 34.4 (C39), 34.5 (C21, C21'), 35.2 (C5), 35.4 (C5'), 35.5 (C9), 35.6 (C9'), 35.8 (C28, C28'), 36.6 (C3), 37.6 (C3'), 40.8 (C28, C28'), 40.9 (C13, C13'), 41.3 (C10, C10'), 42.6 (C4'), 42.8 (C4), 43.5 (C12, C12'), 52.1 (d, ²*J*_{PC} = 6.3 Hz, C57), 52.8 (C34), 56.7 (C17'), 56.9 (C17), 57.2 (C11'), 57.4 (C11), 66.6 (C41), 67.7 (C30, C30'), 67.8 (C30, C30'), 69.3 (C29, C29'), 75.8 (C2), 76.9 (C2'), 78.5 (C29, C29'), 127.6 (C45), 128.4 (C51), 128.7 (C43, C47), 128.9 (C44, C46), 130.2 (C50), 130.9 (C52), 136.5 (C53), 145.2 (C42), 167.7 (C48), 170.9 (C36), 171.0 (C32), 173.1 (C25, C25'), 173.4 (C25, C25'). **³¹P-NMR** (121.5 MHz, CDCl₃/MeOD-*d*₄ = 1:1): δ = 21.3. **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für C₉₁H₁₂₃N₃O₁₃P₂S: m/z 779.9131, gef.: m/z 779.9120.

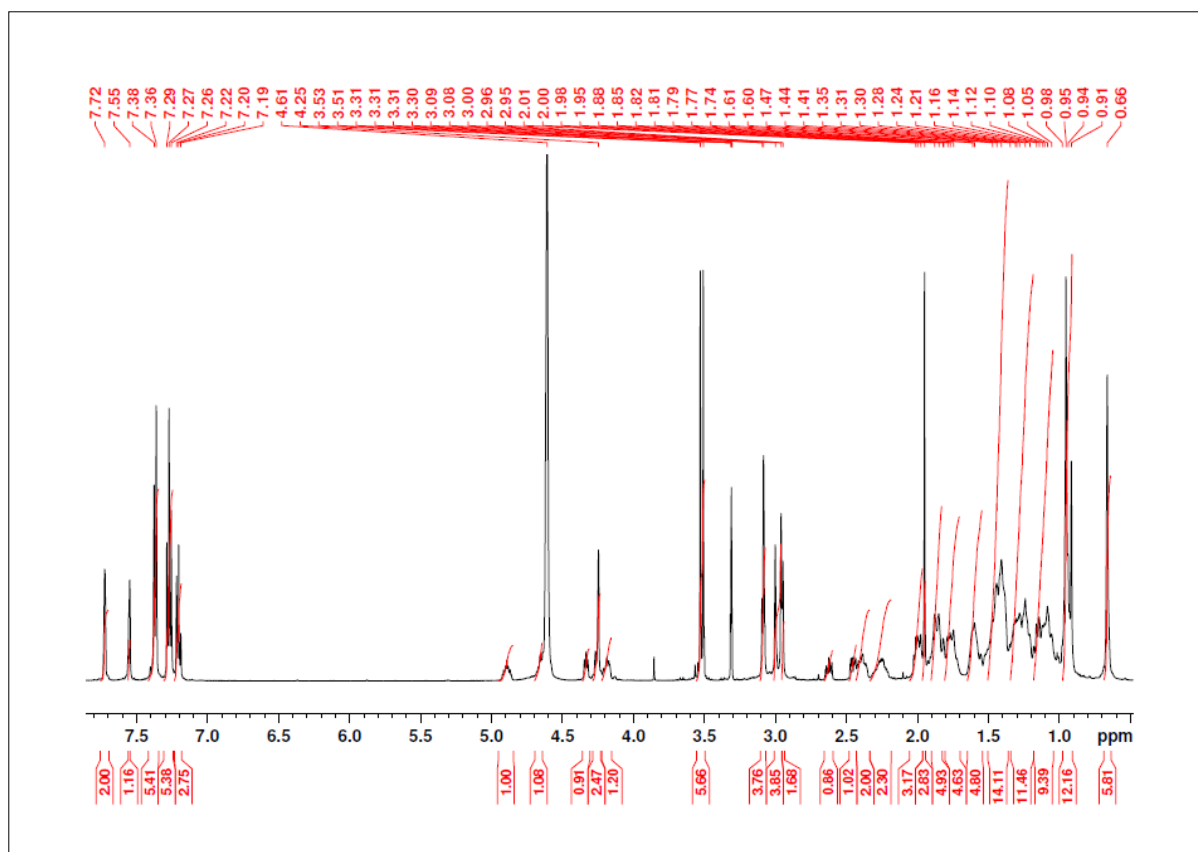


Abbildung 415: ^1H -NMR (500 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}-d_4 = 1:1$): *N*-Acetyl-cystein-(*S*-trityl)-(lithocholsäure-*N*-methyl-propargylamid-Dimer)-BP(OLi) $_2$ 145.

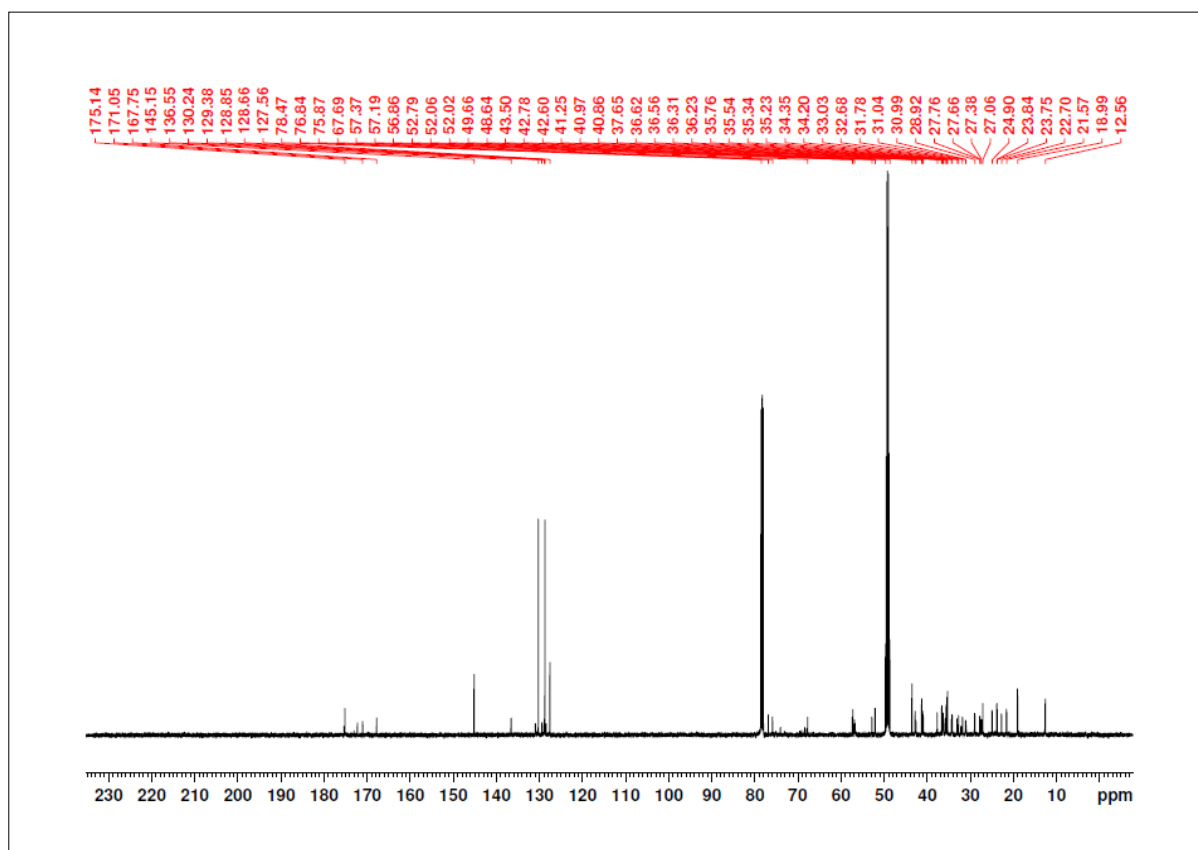
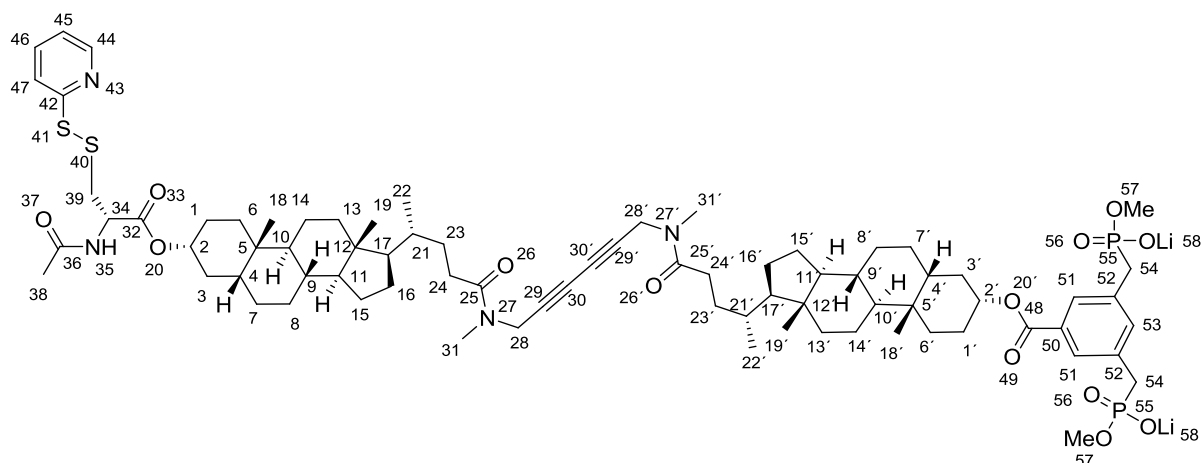


Abbildung 416: ^{13}C -NMR (125.7 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}-d_4 = 1:1$): *N*-Acetyl-cystein-(*S*-trityl)-(lithocholsäure-*N*-methyl-propargylamid-Dimer)-BP(OLi) $_2$ 145.

5.3.9.2 *N*-Acetyl-cystein-(*S*-*S*-pyridin)-(lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-BP(OLi)₂ 139



Ansatz:

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
145 (5.3.9.1)	1572.84	1.0	0.051	0.08	
Triisopropylsilan	158.36	2.0	0.101	0.016	0.021
2,2'-Dithiopyridin	220.31	5.0	0.253	0.056	
TFA					1.0
CH ₂ Cl ₂					5.0
Benzol					18.0
Diethylether					50.0

Durchführung:

0.08 g *N*-Acetyl-cystein-(*S*-trityl)-(lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-BP(OLi)₂ **145** (0.051 mmol, 1 eq) wurden in einem Gemisch aus 5 mL Dichlormethan und 1 mL Trifluoressigsäure gelöst und 0.021 mL Triisopropylsilan (0.101 mmol, 2 eq) zugegeben. Dabei trat eine sofortige Gelbfärbung durch das Triphenylkation ein, die nach 10 min wieder verschwand. Die Reaktionslösung wurde 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 0.056 g 2,2'-Dithiopyridin (0.253 mmol, 5 eq.) zugegeben und das gelbe Reaktionsgemisch für weitere 16 h bei RT gerührt. Die Lösung wurde mit 6 mL Benzol verdünnt und anschließend am Rotationsverdampfer auf 2 mL eingengt. Das so erhaltene Konzentrat wurde zweimal mit je 6 mL Benzol aufgenommen und wiederum eingengt, um die überschüssige Trifluoressigsäure im azeotropen Gemisch vollständig zu entfernen. Das Produkt wurde anschließend mehrere Male mit Diethylether verrieben und gründlich im Ölpumpenvakuum getrocknet. Es konnten 0.074 g (0.049 mmol) eines feinkristallinen, gelben Feststoffs erhalten werden.

Analytik:

Ausbeute: 95 %. **¹H-NMR** (500 MHz, MeOD-*d*₄): δ = 0.73 (s, 3H, H-19, H-19'), 0.74 (s, 3H, H-19, H-19'), 0.96-0.98 (m, 6H, H-18, H-18'), 1.04 (d, $^3J_{HH} = 7.03$ Hz, 6H, H-22, H-22'), 1.04-1.11 (m, 2H, H-6, H-6'), 1.13-1.35 (m, 16H, H-7, H-7', H-8, H-8', H-11, H-11', H-13, H-13', H-14, H-14', H-15, H-15', H-16, H-16', H-17, H-17'), 1.37-1.55 (m, 16H, H-1, H-1', H-4, H-4', H-8, H-8', H-9, H-9', H-10, H-10', H-14, H-14', H-23, H-23'), 1.57-1.61 (m, 2H, H-3, H-3'), 1.63-1.67 (m, 2H, H-15, H-15'), 1.72-1.75 (m, 2H, H-1, H-1'), 1.81-1.99 (m, 10H, H-3, H-3', H-6, H-6', H-7, H-7', H-16, H-16', H-21, H-21'), 2.02-2.06 (m, 2H, H-13, H-13'), 1.98 (s, 3H, H-38), 2.27-2.33 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.41-2.48 (m, 2H, H-24, H-24'), 2.30-2.47 (m, 2H, H-39, H-39'), 3.01 (s, 2H, H-31, H-31'), 3.03 (d, $^2J_{PH} = 21.8$ Hz, 4H, H-54), 3.09 (s, 4H, H-31, H-31'), 3.53 (d, $^2J_{PH} = 10.8$ Hz, 6H, H-57), 4.17 (m, 1.4H, H-28, H-28'), 4.26 (m, 2.6H, H-28, H-28'), 4.34 (ddd, $^3J_{HH} = 5.53$ Hz, $^3J_{HH} = 4.43$ Hz, $^3J_{HH} = 7.61$ Hz, 1H, H-34), 4.60-4.67 (m, 1H, H-2), 4.88-4.91 (m, 1H, H-2'), 7.23-7.24 (m, 1H, H-47), 7.50 (bs, 1H, H-53), 7.79-7.80 (m, 2H, H-45, H-46), 7.81 (bs, 2H, H-51), 8.42 (d, $^3J_{HH} = 5.74$ Hz, 1H, H-44). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, MeOD-*d*₄): δ = 12.4 (C19, C19'), 18.2 (C22'), 18.8 (C22), 19.8 (C14'), 19.9 (C14), 22.1 (C38), 22.3 (C18, C18'), 25.3 (C15, C15'), 28.6 (C8, C8'), 28.9 (C7, C7'), 29.2 (C16, C16'), 31.8 (C24, C24'), 32.2 (C1, C1'), 30.9 (C24, C24'), 31.0 (C23, C23'), 32.2 (d, $^1J_{PC} = 115.3$ Hz, C54), 33.1 (C31, C31'), 33.2 (C31, C31'), 34.8 (C6, C6'), 35.8 (C39), 36.5 (C21, C21'), 37.7 (C5, C5'), 37.8 (C9, C9'), 38.1 (C28, C28'), 38.3 (C3, C3'), 39.0 (C28, C28'), 39.3 (C13, C13'), 41.0 (C10, C10'), 41.2 (C4, C4'), 43.6 (C12, C12'), 52.1 (d, $^2J_{PC} = 6.3$ Hz, C57), 52.8 (C34), 57.2 (C17, C17'), 58.1 (C11, C11'), 67.7 (C30, C30'), 67.8 (C30, C30'), 70.4 (C29, C29'), 75.2 (C2), 75.8 (C2'), 76.9 (C29, C29'), 121.5 (C47), 122.6 (C45), 123.6 (C51), 129.4 (C46), 131.3 (C50), 137.2 (C52), 139.2 (C53), 150.6 (C44), 160.6 (C42), 167.7 (C48), 170.9 (C36), 171.0 (C32), 173.3 (C25, C25'), 174.6 (C25, C25'). **³¹P-NMR** (121.5 MHz, MeOD-*d*₄): δ = 21.3. **HRMS** (ESI neg., MeOH): ber. für C₇₇H₁₁₀N₄O₁₃P₂S₂: m/z 712.8951, gef.: m/z 712.9103.

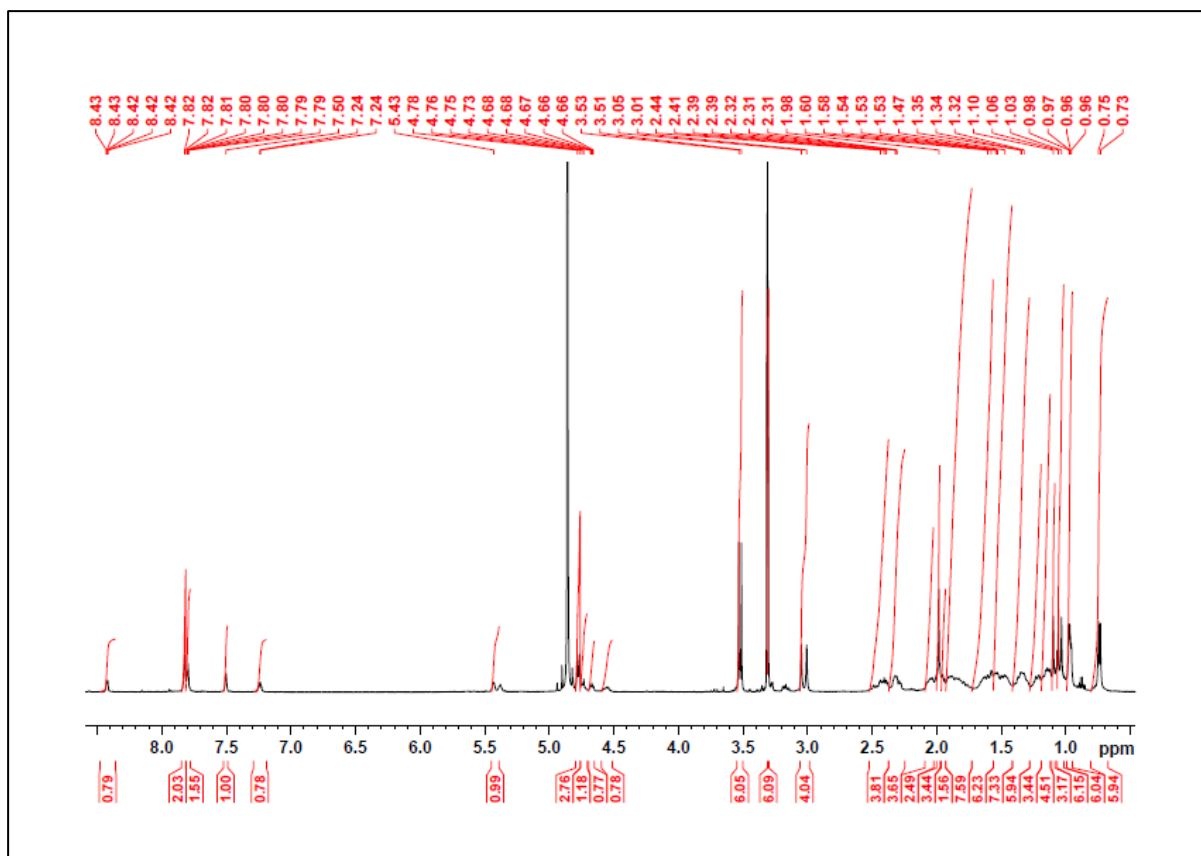


Abbildung 417: ^1H -NMR (500 MHz, $\text{MeOD-}d_4$): *N*-Acetyl-cystein-(*S*-*S*-pyridin)-(lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-BP(OLi)₂ 139.

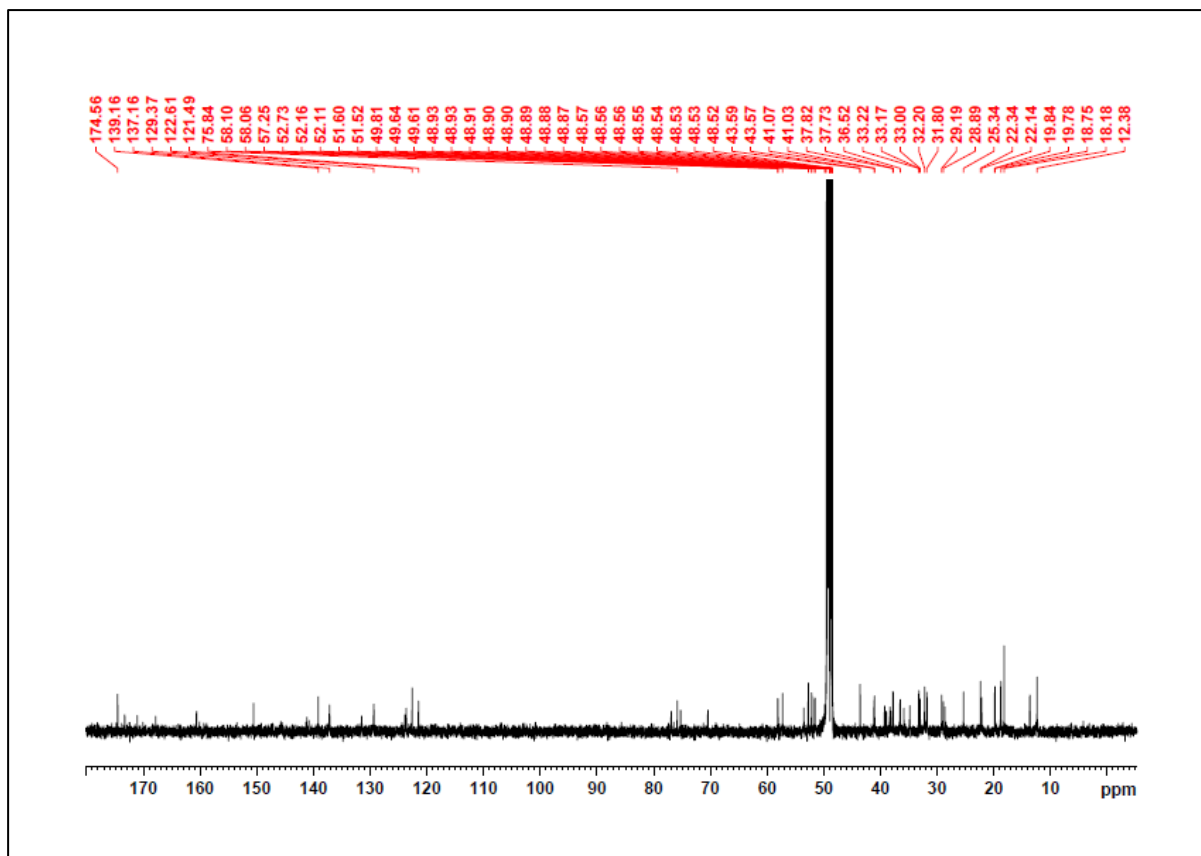
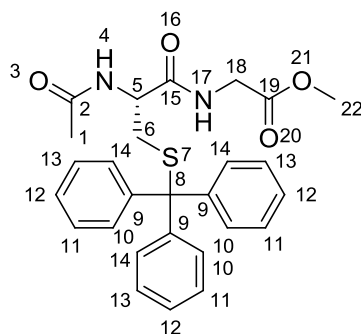


Abbildung 418: ^{13}C -NMR (125.7 MHz, $\text{MeOD-}d_4$): *N*-Acetyl-cystein-(*S*-*S*-pyridin)-(lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer)-BP(OLi)₂ 139.

5.3.10 Synthese des Rezeptors 174 mit photolabiler *o*-Nitrobenzyl-Schutzgruppe

5.3.10.1 *N*-Acetyl-cystein-(*S*-trityl)-*N*-glycinmethylester 176



Ansatz:

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
<i>N</i> -Acetyl-cystein-(<i>S</i> -trityl)-OH	405.51	1.0	1.233	0.5	
Glycinmethylester hydrochlorid	125.55	1.5	1.850	0.232	
HCTU	413.69	1.5	1.850	0.765	
Cl-HOBt	169.57	3.0	3.699	0.627	
DIEA	129.25	4.0	4.932	0.637	0.859
CH ₂ Cl ₂					10.0
DMF					5.0

Durchführung:

0.5 g *N*-Acetyl-cystein-(*S*-trityl)-OH (1.233 mmol, 1 eq.) wurden in 15 mL eines 2 : 1- Gemisches aus Dichlormethan und *N,N'*-Dimethylformamid gelöst. Die Lösung wurde im Eisbad auf 0 °C gekühlt und mit 0.765 g HCTU (1.850 mmol, 1.5 eq.) und 0.627 g Cl-HOBt (3.699 mmol, 3.0 eq.) versetzt. Nachdem sich eine klare Lösung gebildet hatte, wurden 0.859 mL DIEA (0.637 g, 4.932 mmol, 4 eq.) zugegeben und das gelbe Gemisch für 10 min bei 0 °C gerührt. Nach Zugabe von 0.232 g Glycinmethylester hydrochlorid (1.850 mmol, 1.5 eq.) wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmt und für weitere 24 h gerührt. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels DC überprüft. Die Reaktionslösung wurde mit 30 mL Dichlormethan verdünnt. Die organische Phase wurde mit je 60 mL gesättigter NaHCO₃-Lösung, 1 M Salzsäure und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden mit Dichlormethan gegenextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das gelbliche Rohprodukt (0.8 g) wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet und anschließend säulenchro-

matographisch gereinigt (*n*-Hexan : Ethylacetat = 1:4). Es wurden 0.446 g (0.937 mmol) eines feinkristallinen, farblosen Feststoffs isoliert.

Analytik:

Ausbeute: 76 %. **R_F:** 0.51 (*n*-Hexan : Ethylacetat = 1:4). **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ = 1.86 (s, 3H, H-1), 2.55 (dd, $^2J_{HH}$ = 13.04 Hz, $^3J_{HH}$ = 5.76 Hz, 1H, H-6), 2.68 (dd, $^2J_{HH}$ = 13.04 Hz, $^3J_{HH}$ = 5.76 Hz, 1H, H-6), 3.67 (s, 3H, H-20), 3.86 (dd, $^2J_{HH}$ = 13.10 Hz, $^3J_{HH}$ = 5.63 Hz, 1H, H-18), 3.93 (dd, $^2J_{HH}$ = 13.10 Hz, $^3J_{HH}$ = 5.63 Hz, 1H, H-18), 4.11-4.17 (m, 1H, H-5), 6.06 (d, $^3J_{HH}$ = 7.33 Hz, 1H, H-4), 6.77 (t, $^3J_{HH}$ = 5.63 Hz, 1H, H-17), 7.17-7.31 (m, 9H, H-10, H-12, H-14), 7.38-7.41 (m, 6H, H-11, H-13). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, CDCl₃): δ = 23.1 (C15), 33.2 (C6), 41.3 (C18), 52.0 (C22), 52.4 (C5), 67.3 (C8), 127.0 (C12), 128.4 (C14, C16), 129.6 (C11, C13), 144.5 (C9), 169.9 (C19), 170.5 (C2), 170.6 (C15). **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für C₂₇H₂₈N₂O₄SNa: m/z 499.1662, gef.: m/z 499.1694.

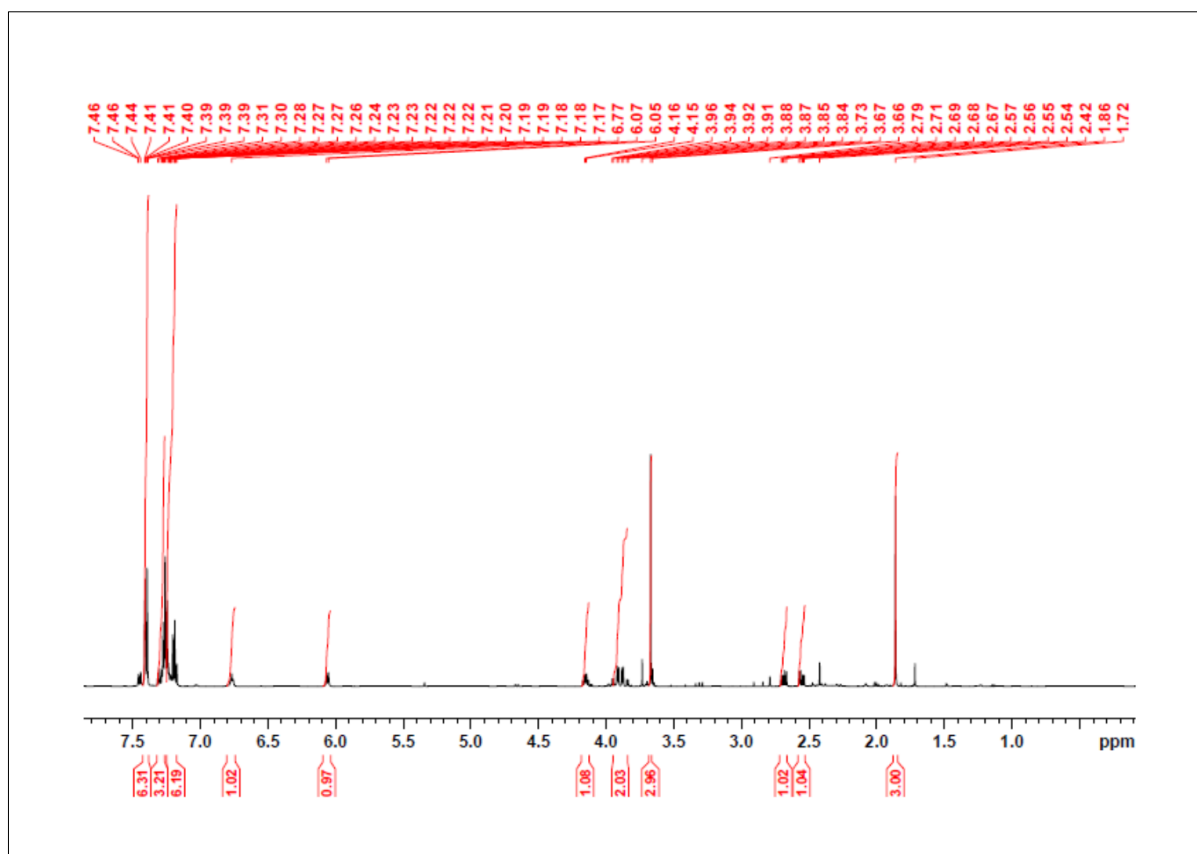


Abbildung 419: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): N-Acetyl-cystein-(S-trityl)-N-glycinmethylester 176.

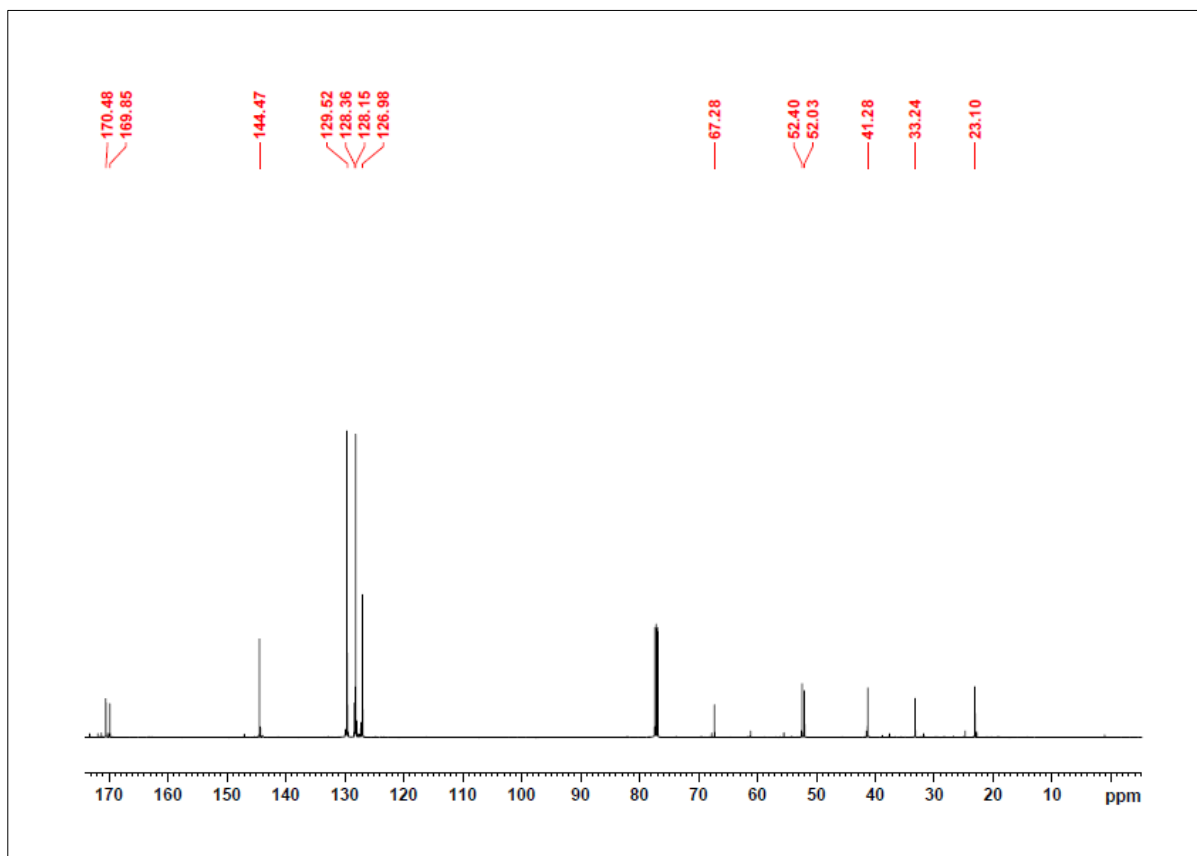
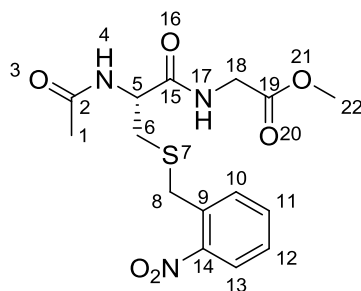


Abbildung 420: ¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃): N-Acetyl-cystein-(S-trityl)-N-glycinmethylester 176.

5.3.10.2 *N*-Acetyl-cystein-(*S*-*o*-nitrobenzyl)-*N*-glycinmethylester **172**Ansatz:

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
176 (5.3.10.1)	476.59	1.0	0.157	0.075	
Triisopropylsilan	158.36	2.2	0.346	0.055	0.071
TFA					1.0
CH ₂ Cl ₂					5.0
Benzol					15.0
<i>o</i> -Nitrobenzylbromid	216.03	2.2	0.346	0.075	
DIEA	129.25	6.0	0.942	0.122	0.164

Durchführung:

0.075 g *N*-Acetyl-cystein-(*S*-trityl)-*N*-glycinmethylester **176** (0.157 mmol, 1 eq) wurden in einem Gemisch aus 5 mL Dichlormethan und 1 mL Trifluoressigsäure gelöst und 0.071 mL Triisopropylsilan (0.055 g, 0.346 mmol, 2.2 eq) zugegeben. Dabei trat eine sofortige Gelbfärbung durch das Triphenylkation ein, die nach 10 min wieder verschwand. Die Reaktionslösung wurde 4 h bei RT gerührt und das Ende der Reaktion mittels DC überprüft. Die Lösung wurde mit 5 mL Benzol verdünnt und anschließend am Rotationsverdampfer auf 2 mL eingengt. Das so erhaltene Konzentrat wurde dreimal mit je 10 mL Benzol aufgenommen und wiederum eingengt, um die überschüssige Trifluoressigsäure im azeotropen Gemisch vollständig zu entfernen. Das erhaltene Rohprodukt wurde in 10 mL Dichlormethan aufgenommen und mit 0.164 mL DIEA (0.122 g, 0.942 mmol, 6.0 eq) versetzt. Anschließend wurden 0.075 g *o*-Nitrobenzylbromid (0.346 mmol, 2.2 eq) zugegeben und das Reaktionsgemisch 12 h bei RT gerührt. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels DC überprüft. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der gelbe, ölige Feststoff (0.1 g) im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wurde anschließend säulenchromatographisch gereinigt (*n*-Hexan : Ethylacetat = 1:3 + 5 % MeOH) und das Produkt im Ölpumpenvakuum getrocknet. Es konnten 0.052 g (0.143 mmol) eines gelben, feinkristallinen Feststoffs isoliert werden.

Analytik:

Ausbeute: 91 %. **R_F:** 0.05 (*n*-Hexan : Ethylacetat = 1:1). **¹H-NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ = 2.04 (s, 3H, H-1), 2.71 (dd, ²J_{HH} = 14.10 Hz, ³J_{HH} = 7.88 Hz, 1H, H-6), 2.94 (dd, ²J_{HH} = 14.10 Hz, ³J_{HH} = 7.88 Hz, 1H, H-6), 3.74 (s, 3H, H-22), 4.02 (dd, ²J_{HH} = 13.10 Hz, ³J_{HH} = 5.63 Hz, 2H, H-18), 4.03 (dd, ²J_{HH} = 13.10 Hz, ³J_{HH} = 5.63 Hz, 2H, H-18), 4.09 (d, ²J_{HH} = 13.48 Hz, 1H, H-8), 4.23 (d, ²J_{HH} = 13.48 Hz, 1H, H-8), 4.56-4.63 (m, 1H, H-5), 6.56 (d, ³J_{HH} = 7.32 Hz, 1H, H-4), 7.05 (t, ³J_{HH} = 6.66 Hz, 1H, H-17), 7.40-7.46 (m, 1H, H-10), 7.54-7.58 (m, 2H, H-11, H-12), 7.99 (d, ³J_{HH} = 7.56 Hz, 1H, H-13). **¹³C-NMR** (75.4 MHz, CDCl₃): δ = 23.3 (C1), 34.0 (C8), 41.5 (C18), 52.4 (C22), 52.6 (C5), 125.7 (C10), 128.7 (C12), 132.6 (C11), 133.5 (C13), 133.8 (C9), 148.6 (C14), 169.9 (C19), 170.5 (C2), 170.7 (C15). **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für C₁₅H₁₉N₃O₆SNa: m/z 392.0887, gef.: m/z 392.0942.

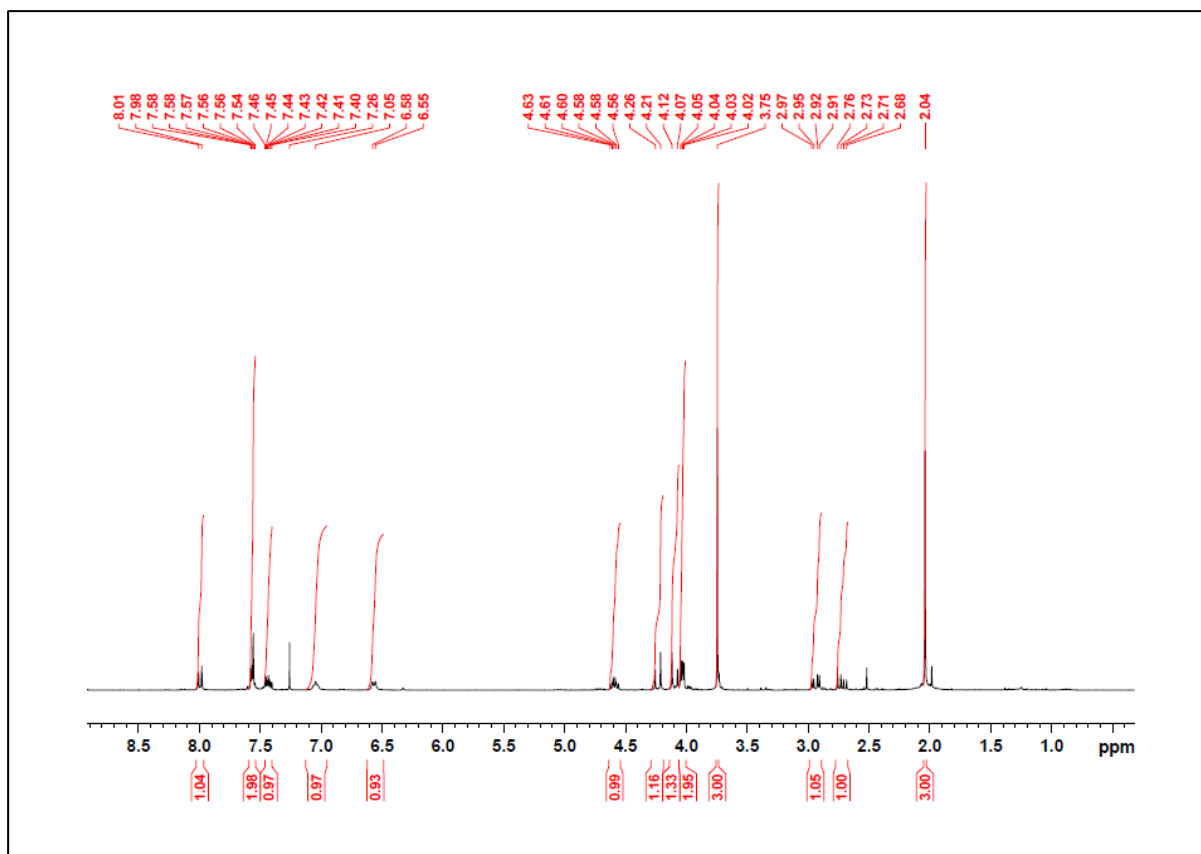


Abbildung 421: ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): *N*-Acetyl-cystein-(*S*-*o*-nitrobenzyl)-*N*-glycinmethylester 172.

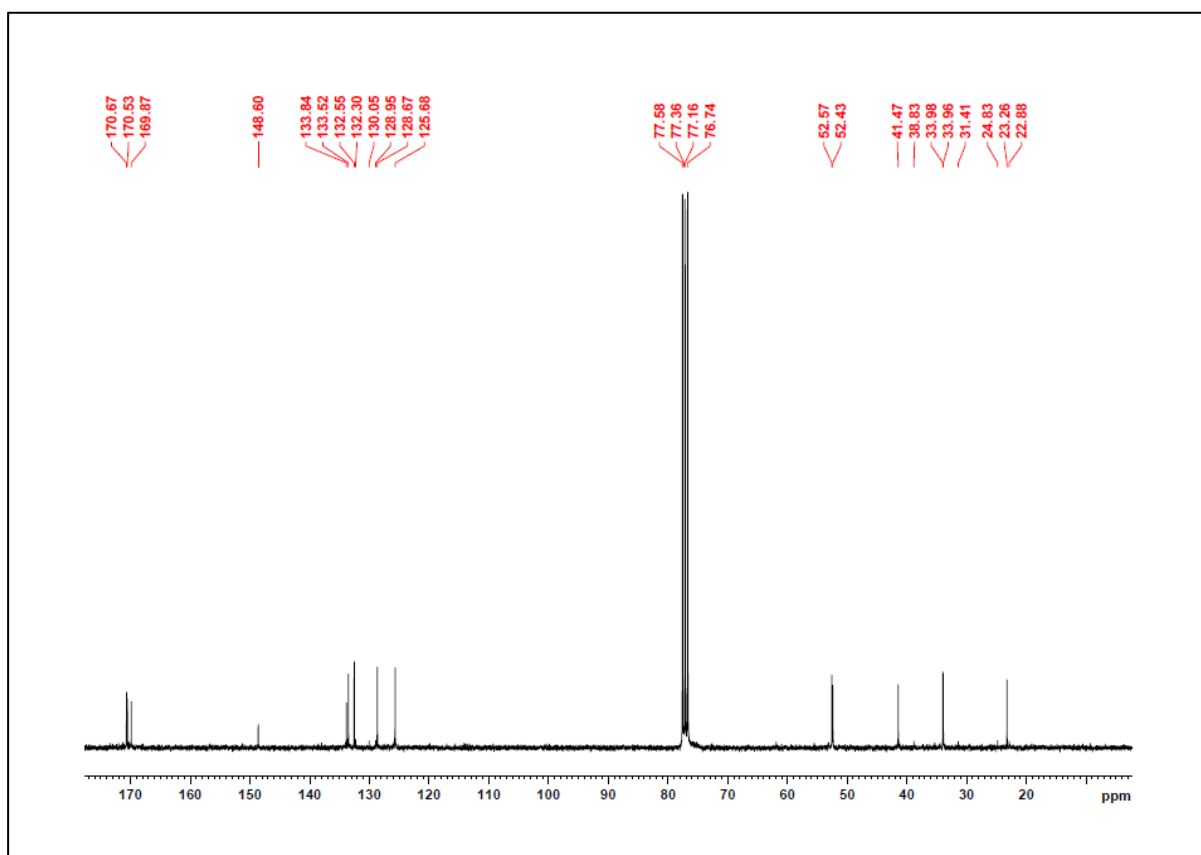
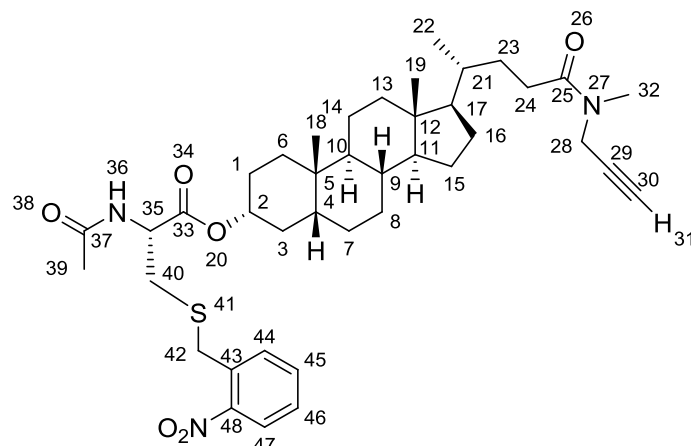


Abbildung 422: ¹³C-NMR (75.4 MHz, CDCl₃): *N*-Acetyl-cystein-(*S*-*o*-nitrobenzyl)-*N*-glycinmethylester 172.

5.3.10.3 *N*-Acetyl-cystein-(*S*-*o*-nitrobenzyl)-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid 173



Ansatz:

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
140 (5.3.8.1)	815.16	1.0	0.123	0.100	
Triisopropylsilan	158.36	2.0	0.245	0.039	0.05
TFA					1.0
CH ₂ Cl ₂					15.0
Benzol					18.0
<i>o</i> -Nitrobenzylbromid	216.03	2.0	0.245	0.053	
DIEA	129.25	6.0	0.736	0.095	0.128

Durchführung:

0.01 g *N*-Acetyl-cystein-(*S*-trityl)-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid **140** (0.123 mmol, 1 eq) wurden in einem Gemisch aus 5 mL Dichlormethan und 1 mL Trifluoressigsäure gelöst und 0.05 mL Triisopropylsilan (0.039 g, 0.245 mmol, 2 eq) zugegeben. Dabei trat eine sofortige Gelbfärbung durch das Triphenylkation ein, die nach 10 min wieder verschwand. Die Reaktionslösung wurde 4 h bei Raumtemperatur gerührt und das Ende der Reaktion mittels DC überprüft. Die Lösung wurde mit 6 mL Benzol verdünnt und anschließend am Rotationsverdampfer auf 2 mL eingengt. Das so erhaltene Konzentrat wurde zweimal mit je 6 mL Benzol aufgenommen und wiederum eingengt, um die überschüssige Trifluoressigsäure im azeotropen Gemisch vollständig zu entfernen. Das erhaltene Rohprodukt wurde in 10 mL Dichlormethan aufgenommen und mit 0.128 mL DIEA (0.095 g, 0.736 mmol, 6.0 eq) versetzt. Anschließend wurden 0.053 g *o*-Nitrobenzylbromid (0.245 mmol, 2 eq) zugegeben und das Reaktionsgemisch 12 h bei RT gerührt. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels DC überprüft. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der ölige, gelbe Feststoff (0.2 g) im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wurde anschließend säulenchromato-

graphisch gereinigt (*n*-Hexan : Ethylacetat = 1:2) und das Produkt im Ölpumpenvakuum getrocknet. Es konnten 0.066 g (0.094 mmol) eines gelben, feinkristallinen Feststoffs isoliert werden.

Analytik:

Ausbeute: 76 %. **R_F:** 0.26 (*n*-Hexan : Ethylacetat = 1:1). **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ = 0.65 (s, 3H, H-19), 0.92 (s, 3H, H-18), 0.93 (d, ³J_{HH} = 6.58 Hz, 3H, H-22), 0.93-1.00 (m, 1H, H-6), 1.02-1.24 (m, 8H, H-7, H-8, H-11, H-13, H-14, H-15, H-16, H-17), 1.26-1.44 (m, 8H, H-1, H-4, H-8, H-9, H-10, H-14, H-23), 1.46-1.49 (m, 1H, H-3), 1.51-1.54 (m, 1H, H-15), 1.61-1.65 (m, 1H, H-1), 1.68-1.89 (m, 5H, H-3, H-6, H-7, H-16, H-21), 1.92-1.95 (m, 1H, H-13), 2.03 (s, 3H, H-39), 2.19 (t, ⁴J_{HH} = 2.43 Hz, 0.7H, H-31), 2.18-2.28 (m, 1H, H-24), 2.29 (t, ⁴J_{HH} = 2.43 Hz, 0.3H, H-31), 2.33-2.46 (m, 1H, H-24), 2.90-2.98 (m, 2H, H-40), 2.98 (s, 1H, H-32), 3.07 (s, 2H, H-32), 4.04 (d, ²J_{HH} = 9.47 Hz, 2H, H-42), 4.13 (d, ⁴J_{HH} = 2.04 Hz, 0.7H, H-28), 4.22 (d, ⁴J_{HH} = 2.04 Hz, 1.3H, H-28), 4.71-4.78 (m, 2H, H-2, H-35), 6.30 (d, ³J_{HH} = 7.52 Hz, 1H, H-36), 7.41-7.51 (m, 2H, H-44, H-45), 7.56 (dt, ³J_{HH} = 7.71 Hz, ⁴J_{HH} = 1.51 Hz, 1H, H-46), 7.98 (d, ³J_{HH} = 7.52 Hz, 1H, H-47). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, CDCl₃): δ = 12.0 (C19), 18.5 (C22), 20.8 (C14), 23.1 (C39), 23.3 (C18), 24.2 (C15), 26.3 (C8), 26.5 (C7), 26.9 (C16), 28.5 (C24), 30.3 (C1), 30.9 (C24), 32.0 (C23), 32.1 (C23), 33.3 (C32), 34.2 (C32), 34.3 (C40), 34.4 (C42), 34.5 (C6), 35.7 (C21), 35.8 (C5), 34.9 (C9), 35.7 (C28), 36.1 (C3), 40.1 (C28), 40.4 (C13), 40.6 (C10), 41.9 (C4), 42.7 (C12), 52.1 (C35), 56.1 (C17), 56.5 (C11), 71.6 (C30), 72.6 (C30), 76.5 (C2), 77.9 (C29), 79.0 (C29), 125.5 (C45), 128.4 (C46), 132.1 (C44), 133.1 (C47), 133.5 (C43), 148.5 (C48), 169.9 (C37), 170.0 (C33), 173.3 (C25). **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für C₄₀H₅₇N₃O₆SNa: m/z 730.3860, gef.: m/z 730.3939.

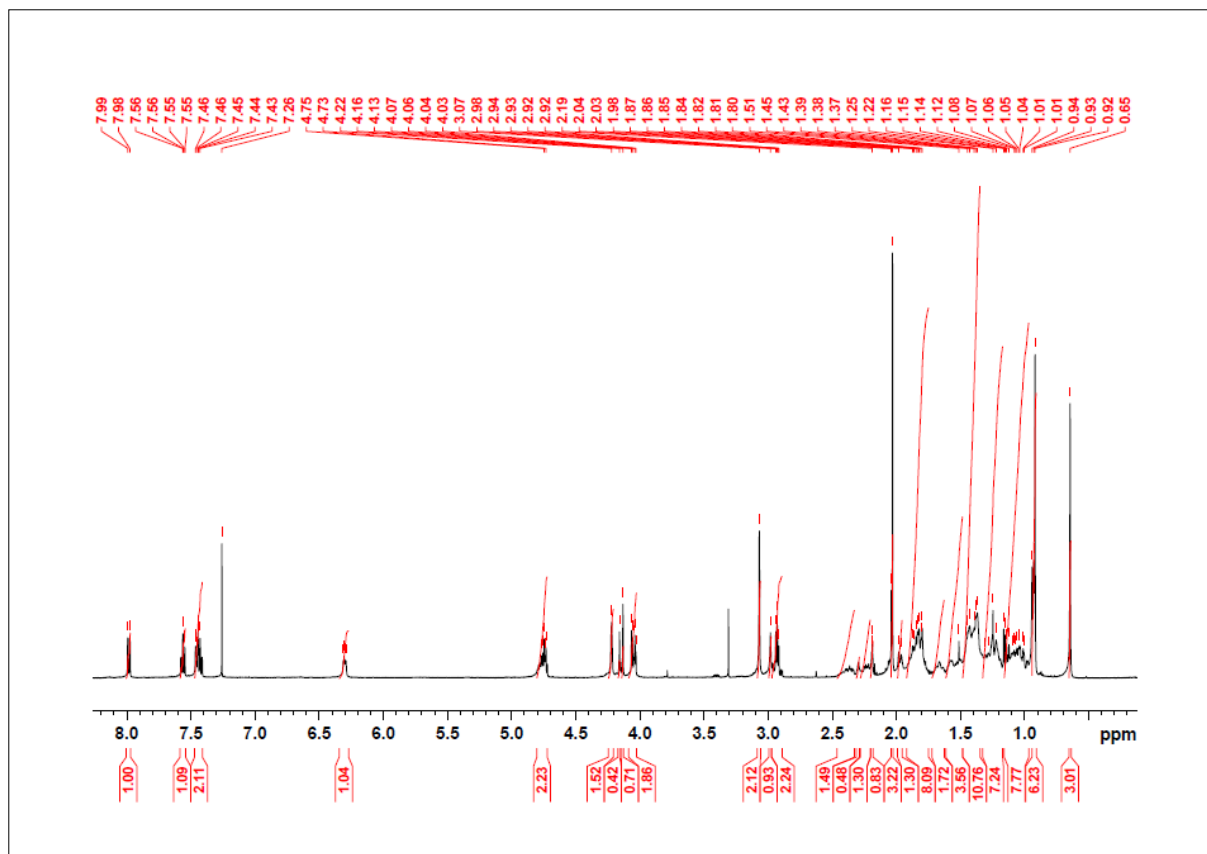


Abbildung 423: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): N-Acetyl-cystein-(*S*-*o*-nitrobenzyl)-lithocholsäure-N-methylpropargylamid 173.

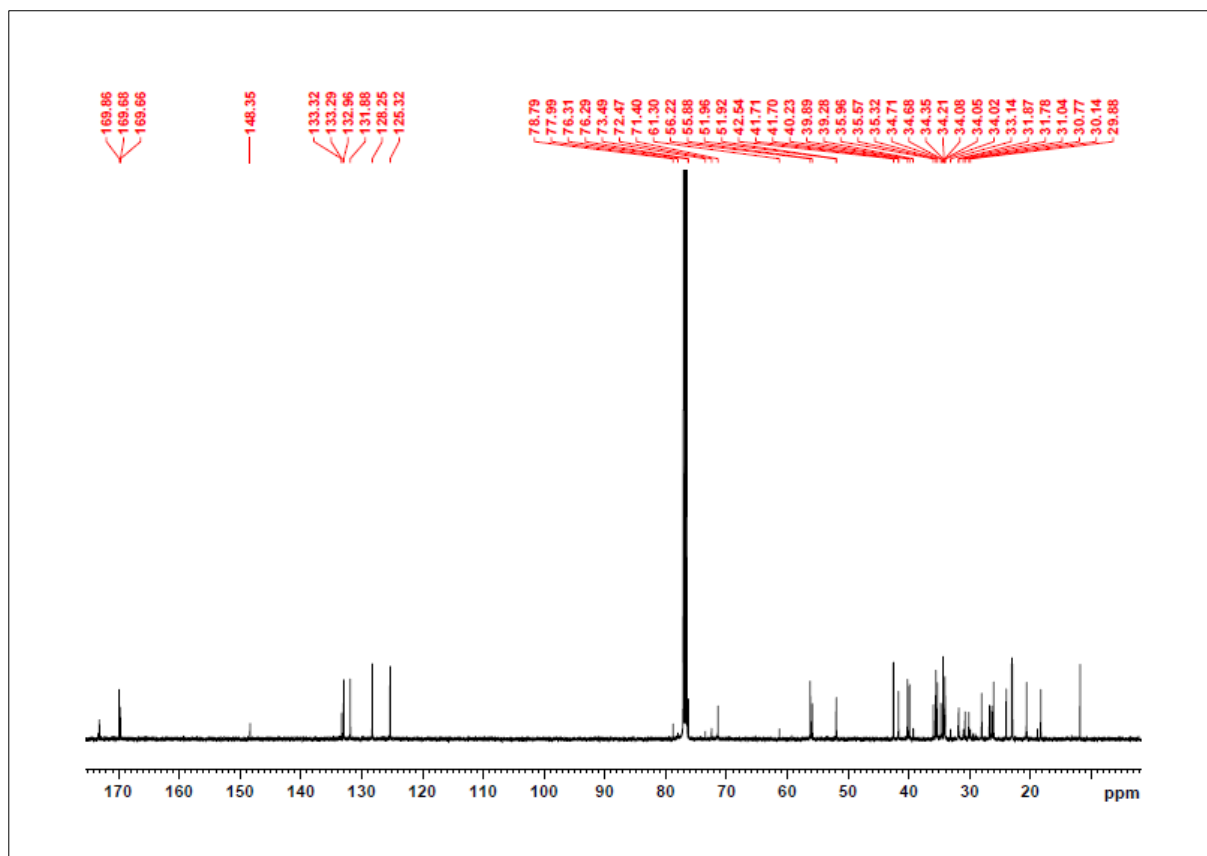
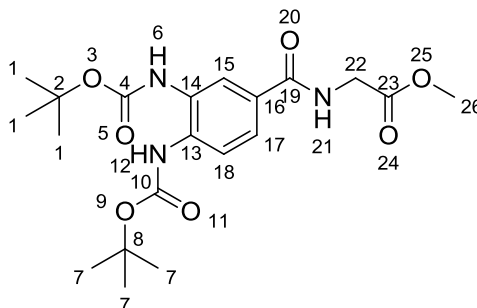


Abbildung 424: ¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃): N-Acetyl-cystein-(*S*-*o*-nitrobenzyl)-lithocholsäure-N-methylpropargylamid 173.

5.3.11 Synthese des Rezeptors 175 mit BIPM-Fluorophor

5.3.11.1 Methyl 2-(3,4-bis(*tert*-butoxycarbonylamino)benzamido)acetat 184



Ansatz:

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
3,4-Diaminobenzoesäure	152.15	1.0	3.286	0.500	
Boc ₂ O	218.25	2.2	7.230	1.578	
Glycinmethylester hydrochlorid	125.55	1.5 (bezogen auf 183)	2.128	0.267	
HCTU	413.69	1.5 (bezogen auf 183)	2.128	0.881	
Cl-HOBt	169.57	3.0 (bezogen auf 183)	4.257	0.722	
DIEA	129.25	4.0 (bezogen auf 183)	5.676	0.734	0.989
MeOH					40.0
DMF					10.0
CH ₂ Cl ₂					5.0

Durchführung:

0.5 g 3,4-Diaminobenzoesäure **183** (3.286 mmol, 1 eq) wurden in 20 ml Methanol suspensiert. Zu dieser Suspension wurden 1.578 g Boc-Anhydrid (7.230 mmol, 2.2 eq), gelöst in 20 mL Methanol langsam zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde 6 h bei RT gerührt. Dabei ging das gebildete Produkt langsam in Lösung. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das rote Rohprodukt im Ölpumpenvakuum getrocknet. Der erhaltene Feststoff wurde ohne Aufreinigung weiter umgesetzt. 0.5 g Methyl 2-(3,4-bis(*tert*-butoxycarbonylamino)benzamido)acetat (1.419 mmol, 1 eq.) wurden in 15 mL eines 2 : 1-Gemisches aus Dichlormethan und *N,N'*-Dimethylformamid gelöst. Die Lösung wurde im Eisbad auf 0 °C gekühlt und mit 0.881 g HCTU (2.128 mmol, 1.5 eq.) und 0.722 g Cl-HOBt (4.257 mmol, 3.0 eq.) versetzt. Nachdem sich eine klare Lösung gebildet hatte, wurden 0.989 mL DIEA (0.734 g, 5.676 mmol, 4 eq.) zugegeben und das gelbe Gemisch für 10 min bei 0 °C gerührt. Nach Zugabe von 0.267 g Glycinmethylester hydrochlorid (2.128 mmol, 1.5 eq.) wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmt und für wei-

tere 24 h gerührt. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels DC überprüft (*n*-Hexan : Ethylacetat = 1:2). Die Reaktionslösung wurde mit 30 mL Dichlormethan verdünnt. Die organische Phase wurde mit je 60 mL gesättigter NaHCO₃-Lösung, 1 M Salzsäure und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden mit Dichlormethan gegenextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das gelbliche Rohprodukt (1.0 g) wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet und anschließend säulenchromatographisch gereinigt (*n*-Hexan : Ethylacetat = 1:2). Es wurden 0.946 g (2.234 mmol) eines feinkristallinen, farblosen Feststoffs isoliert.

Analytik:

Ausbeute: 68 % (über 2 Stufen). **R_F:** 0.34 (*n*-Hexan : Ethylacetat = 1:1). **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ = 1.47 (s, 9H, H-7), 1.48 (s, 9H, H-1), 3.73 (s, 3H, H-26), 4.12 (d, ³J_{HH} = 5.78 Hz, 2H, H-22), 6.96 (t, ³J_{HH} = 5.78 Hz, 1H, H-21), 7.08 (bs, 1H, H-12), 7.27 (bs, 1H, H-6), 7.43 (dd, ³J_{HH} = 5.96 Hz, ⁴J_{HH} = 2.98 Hz, 1H, H-18), 7.63 (d, ³J_{HH} = 8.44 Hz, 1H, H-17), 7.70 (s, 1H, H-15). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, CDCl₃): δ = 28.2 (C7), 28.3 (C1), 41.7 (C22), 52.4 (C26), 81.0 (C8), 81.1 (C2), 122.9 (C15), 124.3 (C17, C18), 129.1 (C14), 129.4 (C16), 134.7 (C13), 153.6 (C10), 154.5 (C4), 167.1 (C19), 170.9 (C23). **HRMS** (ESI pos., MeOH) **184a**: ber. für C₁₇H₂₄N₂O₆Na: m/z 375.1527, gef.: m/z 375.1597. **HRMS** (ESI pos., MeOH) **184**: ber. für C₂₀H₂₉N₃O₇Na: m/z 446.1898, gef.: m/z 446.1901.

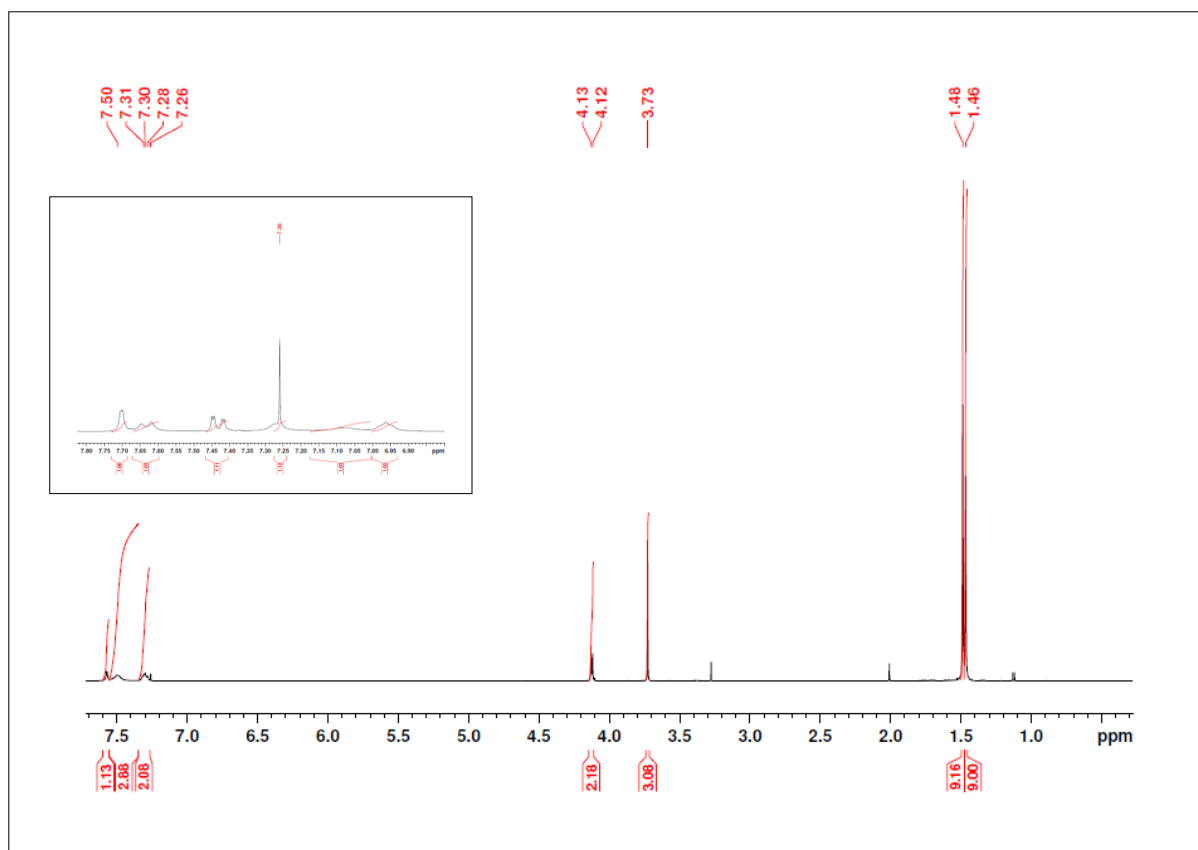


Abbildung 425: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): Metyl 2-(3,4-bis(*tert*-butoxycarbonylamino)benzamido)acetat 184.

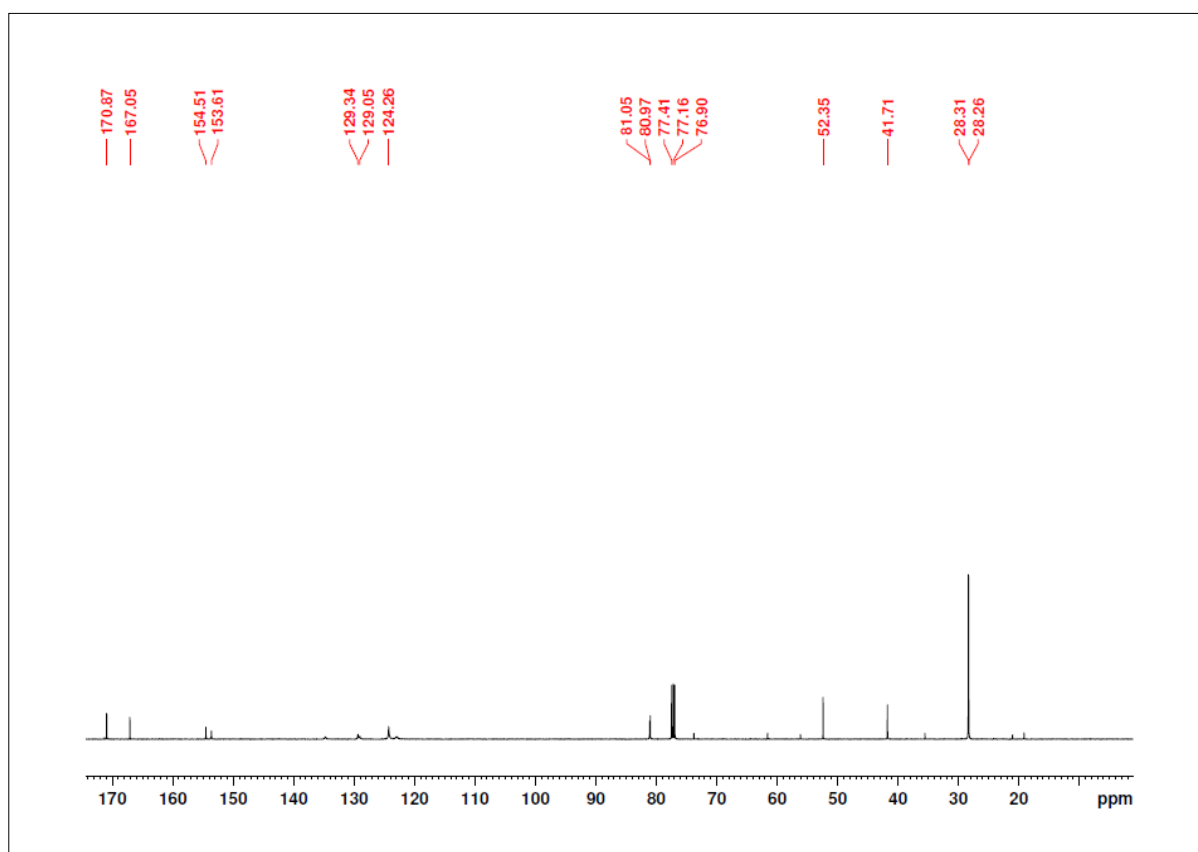
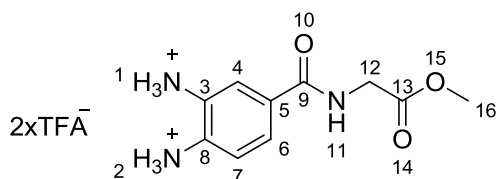


Abbildung 426: ¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃): Metyl 2-(3,4-bis(*tert*-butoxycarbonylamino)benzamido)acetat 184.

5.3.11.2 4-(2-methoxy-2-oxoethylcarbamoyl)benzol-1,2-diaminium trifluoracetat **186**Ansatz:

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
184 (5.3.11.1)	423.46	1.0	0.118	0.05	
TFA					1.0
CH ₂ Cl ₂					5.0
Benzol					24.0

Durchführung:

0.05 g Methyl 2-(3,4-bis(*tert*-butoxycarbonylamino)benzamido)acetat **184** (0.118 mmol, 1 eq) wurden in 5 mL Dichlormethan gelöst und mit 1 mL Trifluoressigsäure versetzt. Die Reaktionslösung wurde 6 h bei RT gerührt und der Reaktionsfortschritt mittels DC überprüft. Die Lösung wurde mit 6 mL Benzol verdünnt und anschließend am Rotationsverdampfer auf 2 mL eingengt. Das so erhaltene Konzentrat wurde dreimal mit je 6 mL Benzol aufgenommen und wiederum eingengt, um die überschüssige Trifluoressigsäure im azeotropen Gemisch vollständig zu entfernen. Das Produkt wurde 48 h im Ölpumpenvakuum getrocknet. Es konnten 0.051 g (0.118 mmol) eines farblosen, Feststoffs erhalten werden.

Analytik:

Ausbeute: 99 %. ¹H-NMR (500 MHz, MeOD-*d*₄): δ = 3.76 (s, 3H, H-16), 4.12 (s, 2H, H-12), 6.46 (d, ³J_{HH} = 8.57 Hz, 1H, H-7), 7.63 (dd, ³J_{HH} = 6.43 Hz, ⁴J_{HH} = 2.35 Hz, 1H, H-6), 7.73 (d, ⁴J_{HH} = 2.35 Hz, 1H, H-4). ¹³C-NMR (125.7 MHz, MeOD-*d*₄): δ = 42.5 (C12), 52.8 (C16), 118.2 (C7), 120.7 (C4, C6), 124.2 (C5), 125.0 (C3), 128.1 (C8), 169.4 (C9), 172.3 (C13). **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für C₁₀H₁₃N₃O₃Na: m/z 246.0849, gef.: m/z 246.0860; ber. für C₁₀H₁₄N₃O₃: m/z 224.1030, gef.: m/z 224.1046.

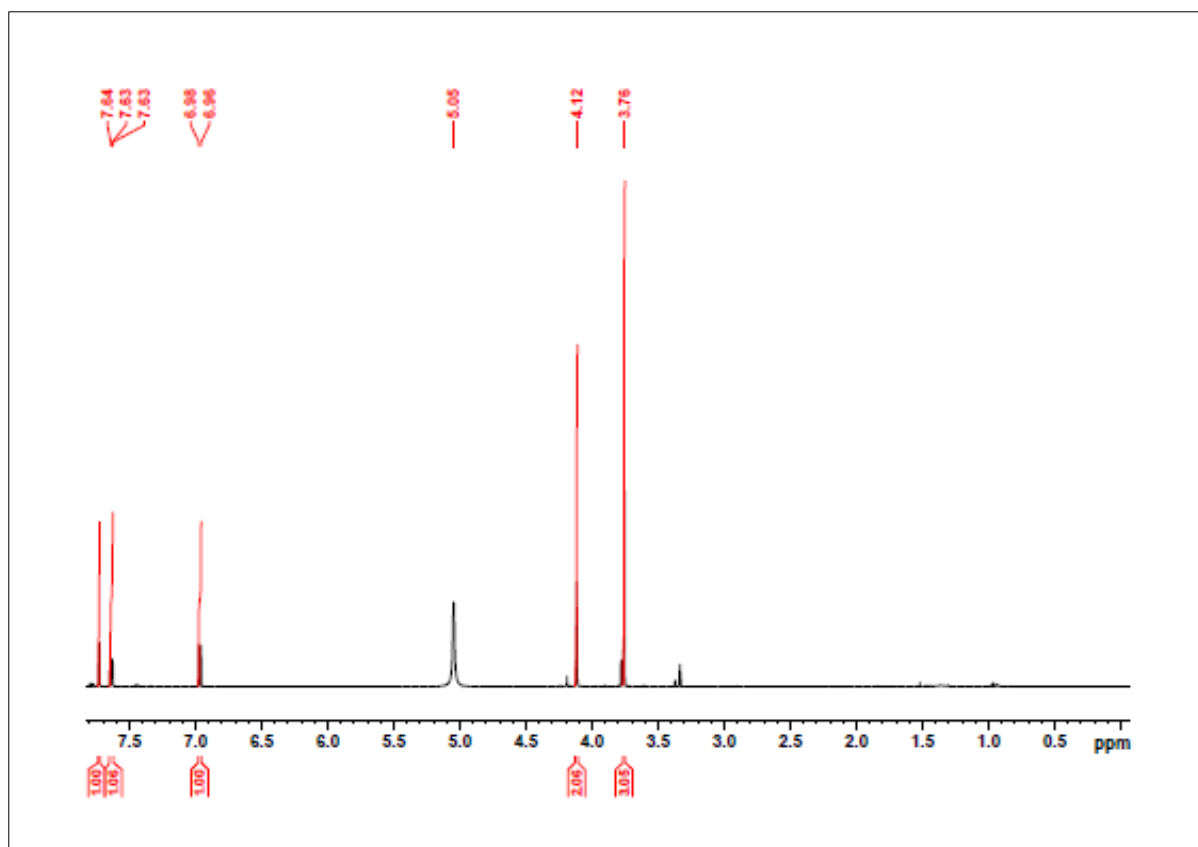


Abbildung 427: ¹H-NMR (500 MHz, MeOD-*d*₄): 4-(2-methoxy-2-oxoethylcarbamoyl)benzol-1,2-diaminium trifluoroacetat 186.

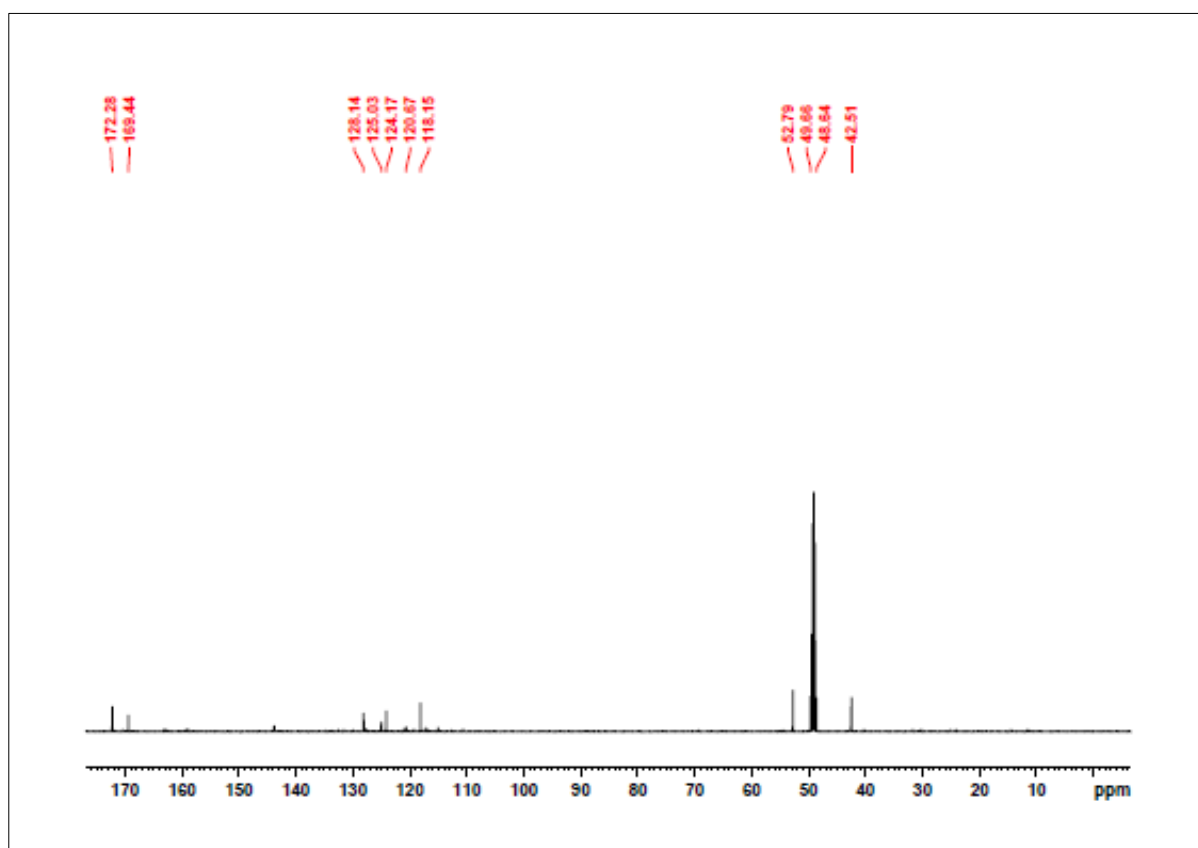
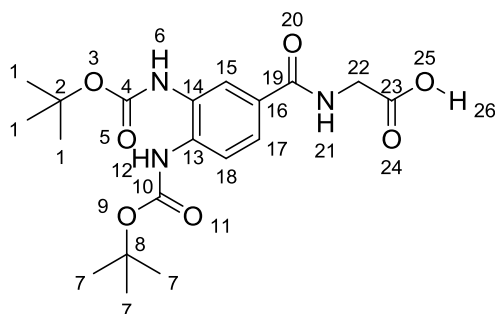


Abbildung 428: ¹³C-NMR (125.7 MHz, MeOD-*d*₄): 4-(2-methoxy-2-oxoethylcarbamoyl)benzol-1,2-diaminium trifluoroacetat 186.

5.3.11.3 Methyl 2-(3,4-bis(*tert*-butoxycarbonylamino)benzamido)essigsäure **185**



Ansatz:

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
184 (5.3.11.1)	423.46	1.0	0.118	0.05	
LiOH	23.95	15.0	1.771	0.043	
MeOH					9.0
H ₂ O					3.0

Durchführung:

0.05 g Methyl 2-(3,4-bis(*tert*-butoxycarbonylamino)benzamido)acetat **184** (0.118 mmol, 1 eq) wurden in 12 mL eines 3 : 1-Gemisches aus Methanol und Wasser gelöst und mit 0.043 g Lithiumhydroxid (1.771 mmol, 15.0 eq) versetzt. Das Gemisch wurde 2 h bei RT gerührt. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels DC überprüft. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Methanol unter vermindertem Druck entfernt und das wässrige Konzentrat mit 1 M Salzsäure auf pH = 6.0 angesäuert und fünfmal mit 10 mL Ethylacetat extrahiert. Die abgetrennten organischen Phasen wurden vereinigt, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene farblose, feinkristalline Produkt (0.049 g, 0.017 mmol) wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Analytik:

Ausbeute: 98 %. ¹H-NMR (300 MHz, MeOD-*d*₄): δ = 1.52 (s, 9H, H-7), 1.53 (s, 9H, H-1), 4.08 (s, 2H, H-22), 7.62 (dd, ³J_{HH} = 8.51 Hz, ⁴J_{HH} = 2.13 Hz, 1H, H-18), 7.71 (d, ³J_{HH} = 8.51 Hz, 1H, H-17), 7.70 (s, 1H, H-15). ¹³C-NMR (75.5 MHz, MeOD-*d*₄): δ = 28.7 (C7), 28.8 (C1), 42.4 (C22), 81.9 (C8), 82.0 (C2), 123.9 (C15), 125.5 (C17, C18), 130.8 (C14), 131.0 (C16), 136.2 (C13), 155.3 (C10), 156.2 (C4), 169.7 (C19), 173.3 (C23). **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für C₁₉H₂₇N₃O₇Na: m/z 432.1741, gef.: m/z 432.1775.

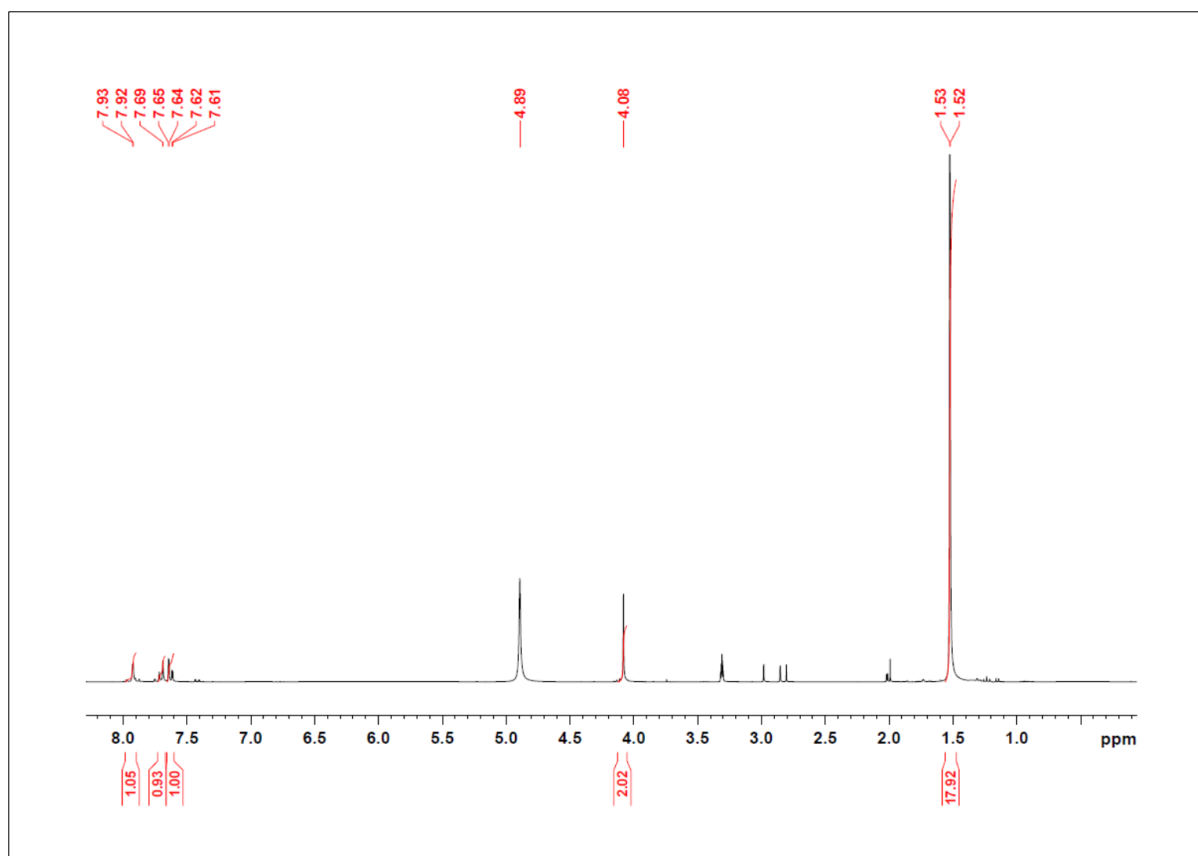


Abbildung 429: ¹H-NMR (300 MHz, MeOD-*d*₄): Methyl 2-(3,4-bis(*tert*-butoxycarbonylamino)benzamido)essigsäure 185.

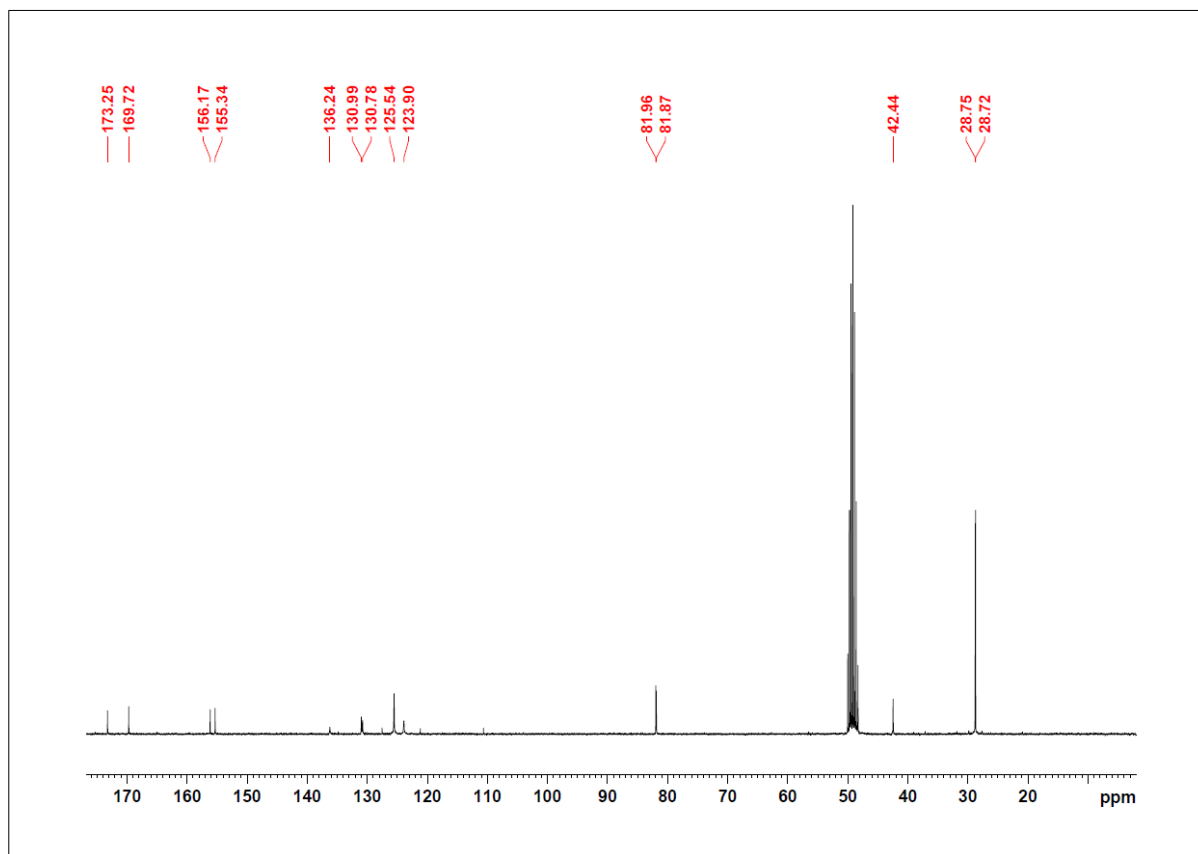
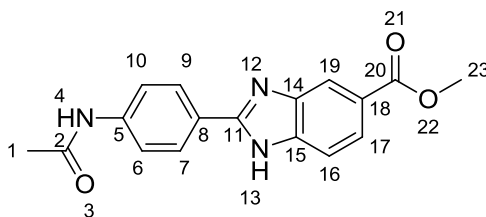


Abbildung 430: ¹³C-NMR (75.5 MHz, MeOD-*d*₄): Methyl 2-(3,4-bis(*tert*-butoxycarbonylamino)benzamido)essigsäure 185.

5.3.11.4 Methyl 2-(4-acetamidophenyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-carboxylat **167**Ansatz:

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
3,5-Diaminobenzoessäuremethylester 166	166.18	1.0	6.018	1.0	
<i>p</i> -Acetoaminobenzoessäure 162		1.2	7.221	1.29	
Trimethylsilylpolyposphatester				5.0	

Durchführung:

Ein Gemisch aus 1 g 3,5-Diaminobenzoessäuremethylester **166** (6.018 mmol, 1 eq) und 5 g Trimethylsilylpolyposphatester wurden unter starkem Rühren auf 110 °C erhitzt. Nachdem **166** in Lösung gegangen war, wurden 1.08 g *p*-Acetoaminobenzoessäure **162** (6.018 mmol, 1 eq) zugegeben. Nach 20 min wurde die Reaktionslösung mit weiteren 0.22 g *p*-Acetoaminobenzoessäure (1.204 mmol, 0.2 eq) versetzt. 30 min später wurde das Gemisch im Eisbad gekühlt und mit 100 mL dest. Wasser verdünnt, um den Überschuss an Trimethylsilylpolyposphatester zu hydrolysieren. Durch langsame Zugabe von gesättigter NaHCO₃-Lösung wurde das Gemisch neutralisiert. Dabei fiel das farblose Produkt in Form feiner Nadeln aus. Es wurde abfiltriert und zweimal mit je 20 mL kaltem Wasser gewaschen. Anschließend wurde das Produkt aus Ethanol umkristallisiert und gründlich im Ölpumpenvakuum getrocknet. Es konnten 1.12 g (3.611 mmol) eines farblosen, feinkristallinen Feststoffs **167** erhalten werden.

Analytik:

Ausbeute: 60 %. **¹H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.08 (s, 3H, H-1), 3.86 (s, 3H, H-23), 7.62 (d, ³*J*_{HH} = 8.75 Hz, 1H, H-17), 7.75 (d, ³*J*_{HH} = 8.75 Hz, 2H, H-6, H-10), 7.81 (d, ³*J*_{HH} = 8.75 Hz, 1H, H-16), 8.10 (s, 1H, H-19), 8.13 (d, ³*J*_{HH} = 8.51 Hz, 2H, H-7, H-9), 10.20 (s, 1H, H-13). **¹³C-NMR** (75.4 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 24.1 (C1), 51.9 (C23), 114.5 (C16), 116.6 (C19), 118.9 (C6, C10), 122.9 (C8), 124.3 (C17), 127.4 (C7, C9), 127.5 (C18), 139.6 (C5), 141.2 (C15), 143.1 (C14), 154.2 (C11), 166.8 (C20), 168.6 (C2). **IR** (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3160 (m), 3118 (m), 2951 (m), 1672 (s), 1604 (s), 1542 (s), 1504 (s), 1423 (s), 1371 (s), 1299 (s), 1314 (s), 1221 (s), 1184 (s), 1105 (s), 1022 (m), 987 (m), 968 (m), 898 (m), 834 (m), 770 (m), 745 (s), 690 (s). **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für C₁₇H₁₆N₃O₃: m/z 310.1186, gef.: m/z 310.1211.

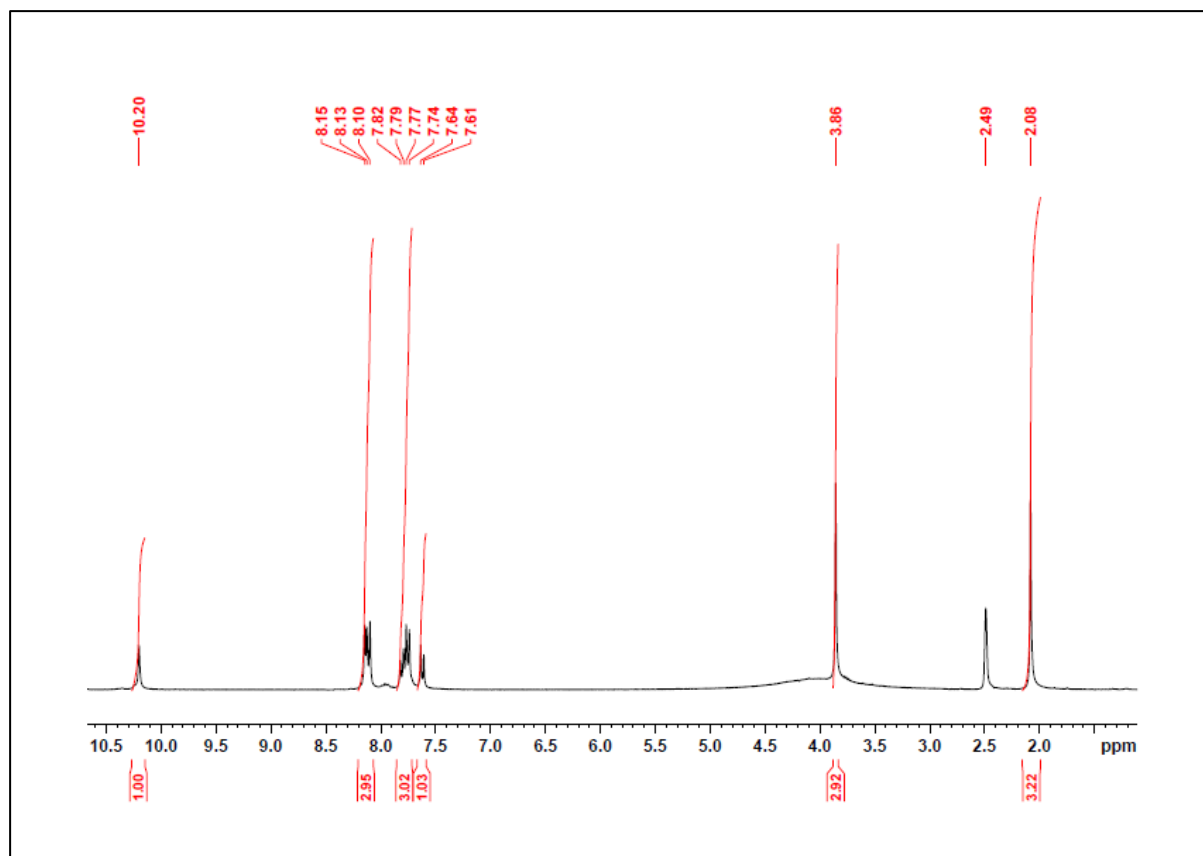


Abbildung 431: ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): Methyl 2-(4-acetamidophenyl)-1H-benzo[d]imidazol-5-carboxylat 167.

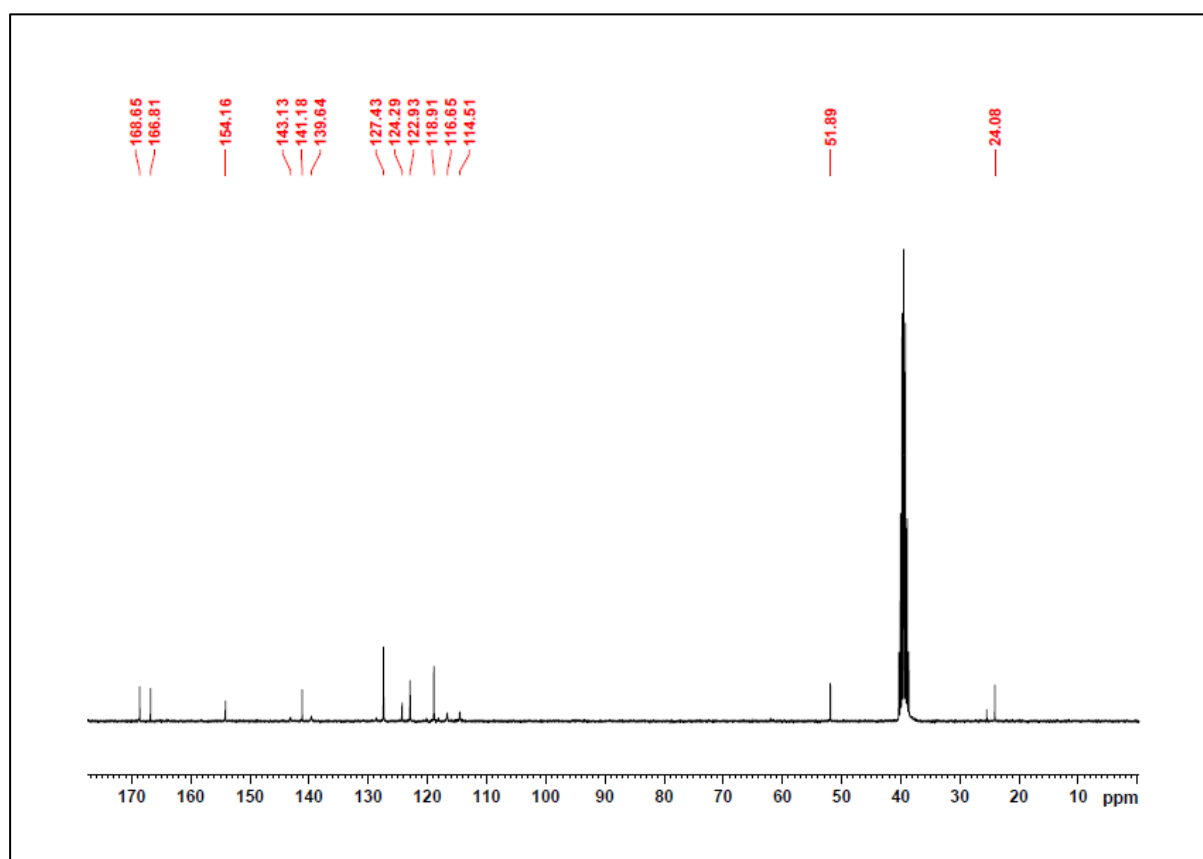
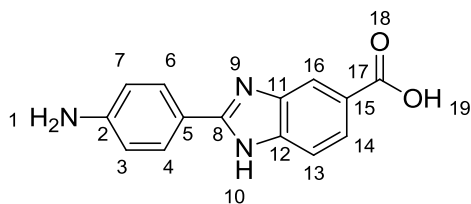


Abbildung 432: ¹³C-NMR (75.4 MHz, DMSO-*d*₆): Methyl 2-(4-acetamidophenyl)-1H-benzo[d]imidazol-5-carboxylat 167.

5.3.11.5 2-(4-aminophenyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-carbonsäure **181****Ansatz:**

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
167 (5.3.11.6)	309.32	1.0	3.233	1.0	
Konz. H ₂ SO ₄					1.0
H ₂ O					2.5
Ethanol					15.0

Durchführung:

Ein Gemisch aus 1 g 4 Methyl 2-(4-acetamidophenyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-carboxylat **167** (3.233 mmol, 1 eq), 1 mL konz. H₂SO₄, 2.5 mL H₂O und 15 mL Ethanol wurde für 3.5 h unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen auf RT wurde das Ethanol unter vermindertem Druck entfernt und das Gemisch über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Dabei fiel das Produkt in Form gelber Nadeln aus. Das Rohprodukt wurde abfiltriert, mit wenig Ethanol gewaschen und gründlich im Ölpumpenvakuum getrocknet. Es konnte 0.712 g (2.813 mmol) eines farblosen Feststoffs **181** erhalten werden.

Analytik:

Ausbeute: 87 %. **¹H-NMR** (300 MHz, MeOD-*d*₄): δ = 6.79 (d, ³*J*_{HH} = 8.73 Hz, 2H, H-3, H-7), 6.58 (d, ³*J*_{HH} = 8.73 Hz, 1H, H-14), 6.85 (d, ³*J*_{HH} = 8.73 Hz, 2H, H-4, H-6), 7.95 (dd, ³*J*_{HH} = 8.40 Hz, ⁴*J*_{HH} = 1.83 Hz, 1H, H-13), 8.24 (d, ⁴*J*_{HH} = 1.84 Hz, 1H, H-16). **¹³C-NMR** (75.4 MHz, MeOD-*d*₄): δ = 117.1 (C13), 118.2 (C5), 119.4 (C16), 119.7 (C7), 128.2 (C3), 129.1 (C6), 132.2 (C4), 141.2 (C11), 145.0 (C2), 155.8 (C12), 159.0 (C8), 172.9 (C17). **IR** (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3366 (m), 2360 (s), 2341 (s), 1630 (s), 1607 (s), 1561 (s), 1503 (s), 1364 (s), 1225 (m), 1188 (s), 1150 (m), 1104 (m), 945 (w), 879 (m), 845 (s), 824 (s), 779 (s), 735 (s), 692 (s). **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für C₁₄H₁₂N₃O₂: m/z 254.0924, gef.: m/z 254.0956.

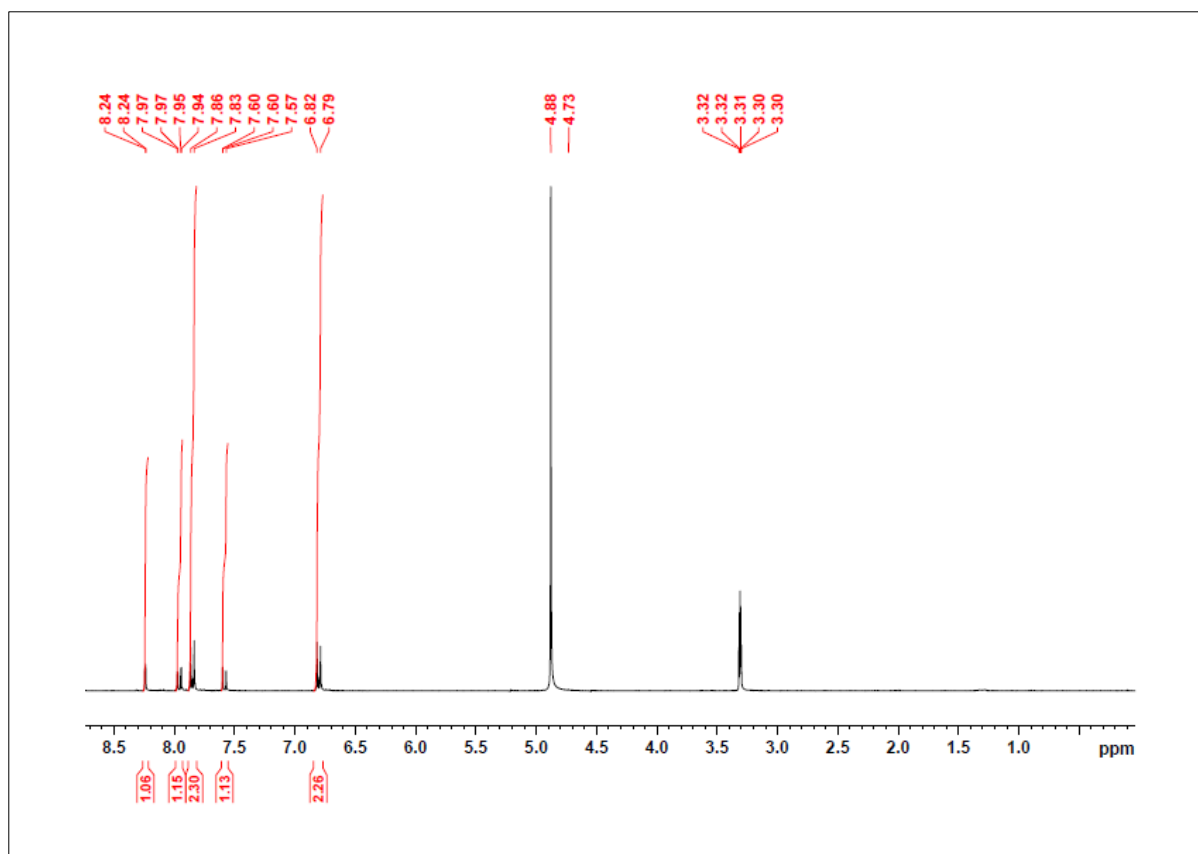


Abbildung 433: ¹H-NMR (300 MHz, MeOD-*d*₄): 2-(4-aminophenyl)-1H-benzo[d]imidazol-5-carbonsäure 181.

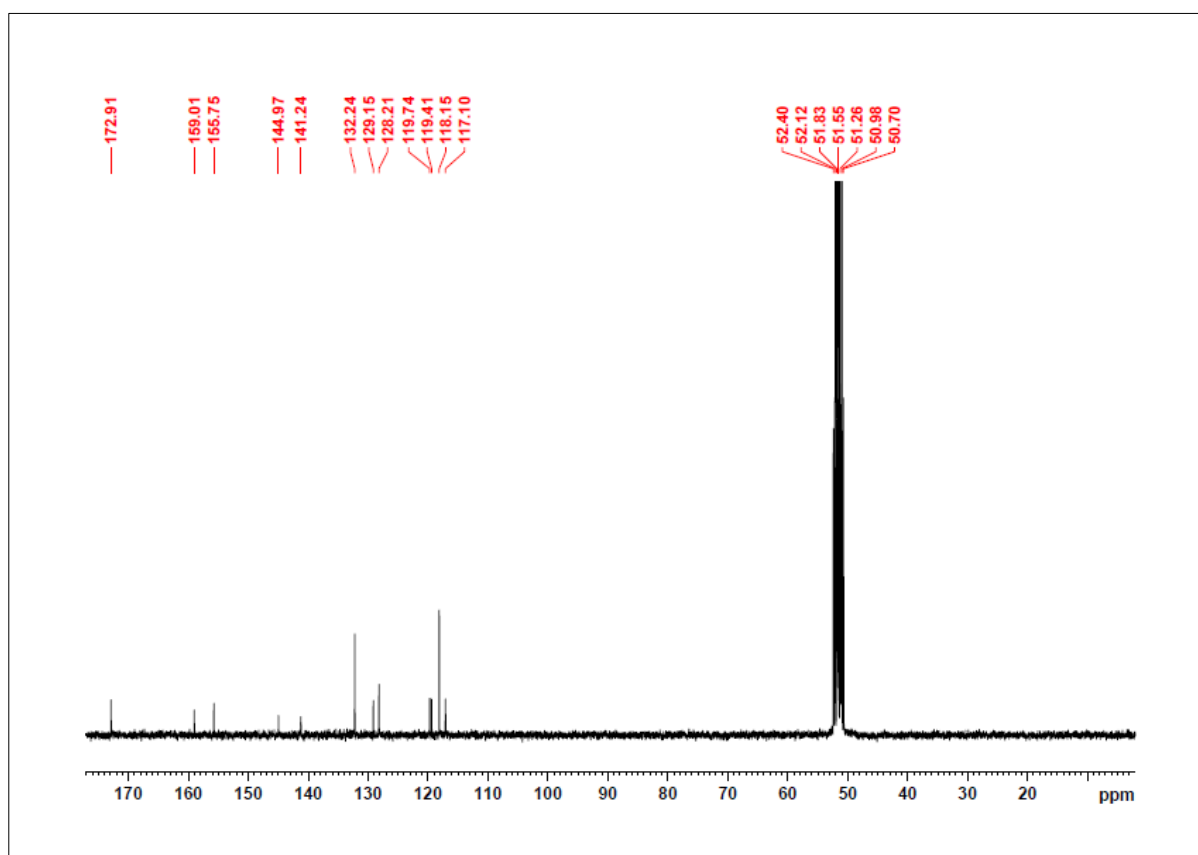
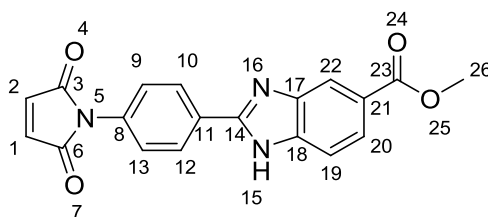


Abbildung 434: ¹³C-NMR (75.4 MHz, MeOD-*d*₄): 2-(4-aminophenyl)-1H-benzo[d]imidazol-5-carbonsäure 181.

5.3.11.6 Methyl 2-(4-(2,5-dioxo-2H-pyrrol-1-(5H)-yl)-phenyl)-1H-benzo[d]imidazol-5-carboxylat **171**



Ansatz:

Edukte	MW	eq.	mmol	g	mL
161	267.28	1.0	0.187	0.05	
Maleinsäureanhydrid	98.06	1.0	0.187	0.018	
DIC	126.20	1.2	0.225	0.028	0.035
4-DMAP	122.17	0.2	0.038	0.005	
CH ₂ Cl ₂					20.0

Durchführung:

0.05 g 2-(4-aminophenyl)-1H-benzo[d]imidazol-5-carbonsäuremethylester **161** (0.187 mmol, 1 eq.) wurden in 15 mL Dichlormethan gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu dieser Lösung wurden 0.018 g Maleinsäureanhydrid (0.187 mmol, 1.0 eq), gelöst in 5 mL Dichlormethan langsam zugetropft. Das Gemisch wurde für 30 min bei RT gerührt. Danach wurden 0.035 mL *N,N*-Diisopropylcarbodiimid (0.028 g, 0.225 mmol, 1.2 eq.) und 0.005 g 4-DMAP (0.038 mmol, 0.2 eq.) zugegeben und die Reaktionslösung für weitere 10 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt aus Ethanol umkristallisiert. Es konnten 0.044 g (0.126 mmol) eines braunen, feinkristallinen Feststoffs isoliert werden.

Analytik:

Ausbeute: 67 %. **R_F:** 0.16 (*n*-Hexan : Ethylacetat = 1:1). **¹H-NMR** (300 MHz, CDCl₃ : MeOD-*d*₄ = 1:2): δ = 3.93 (s, 3H, H-26), 6.95 (s, 2H, H-1, H-2), 7.56 (d, ³*J*_{HH} = 2.10 Hz, 1H, H-9), 7.58 (d, ³*J*_{HH} = 2.10 Hz, 1H, H-13), 7.62 (d, ³*J*_{HH} = 8.26 Hz, 1H, H-20), 7.95 (dd, ³*J*_{HH} = 6.81 Hz, ⁴*J*_{HH} = 1.57 Hz, 1H, H-19), 8.18 (d, ³*J*_{HH} = 2.10 Hz, 1H, H-10), 8.20 (d, ³*J*_{HH} = 2.10 Hz, 1H, H-12), 8.30 (s, 1H, H-22). **¹³C-NMR** (75.4 MHz, CDCl₃ : MeOD-*d*₄ = 1:2): δ = 52.4 (C26), 115.0 (C19), 117.9 (C22), 125.0 (C21), 125.3 (C20), 126.8 (C10, C12), 128.1 (C9, C13), 128.7 (C8), 134.3 (C17), 135.1 (C1, C2), 139.3 (C18), 154.1 (C14), 168.5 (C23), 170.1 (C3, C6). **IR** (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3317 (m), 3061 (w), 2924 (w), 2853 (w), 2360 (m), 1717 (s), 1690 (s), 1607 (m), 1582 (m), 1553 (m), 1505 (s), 1432 (s), 1374 (s), 1302 (s), 1223 (s), 1187 (m), 1147 (m), 1085 (m), 1031 (m), 979 (m), 950 (m), 923 (m), 839 (s), 771 (s), 741 (s), 689 (s). **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für C₁₉H₁₄N₃O₄: *m/z* 348.0979, gef.: *m/z* 348.1022.

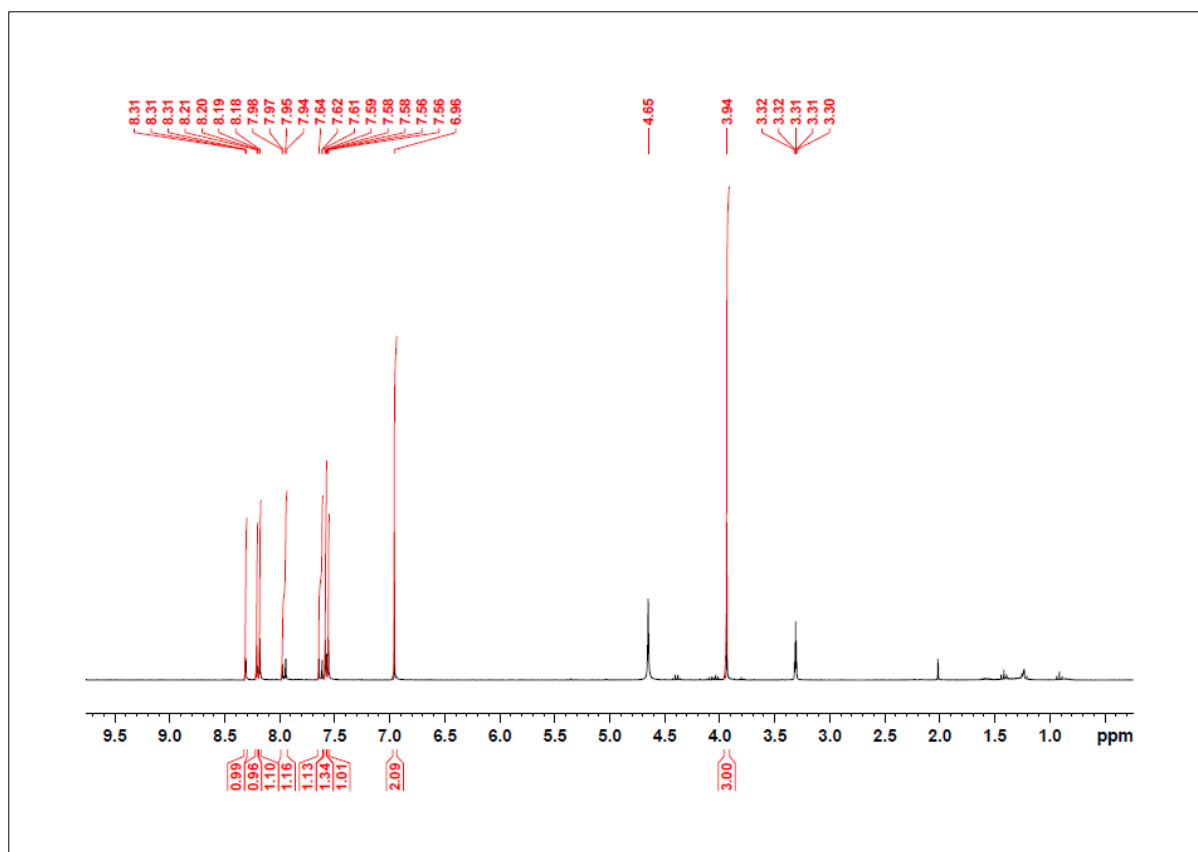


Abbildung 435: ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃:MeOD-*d*₄ = 1:2): Methyl 2-(4-(2,5-dioxo-2H-pyrrol-1-(5H)-yl)-phenyl)-1H-benzo[*d*]imidazol-5-carboxylat 171.

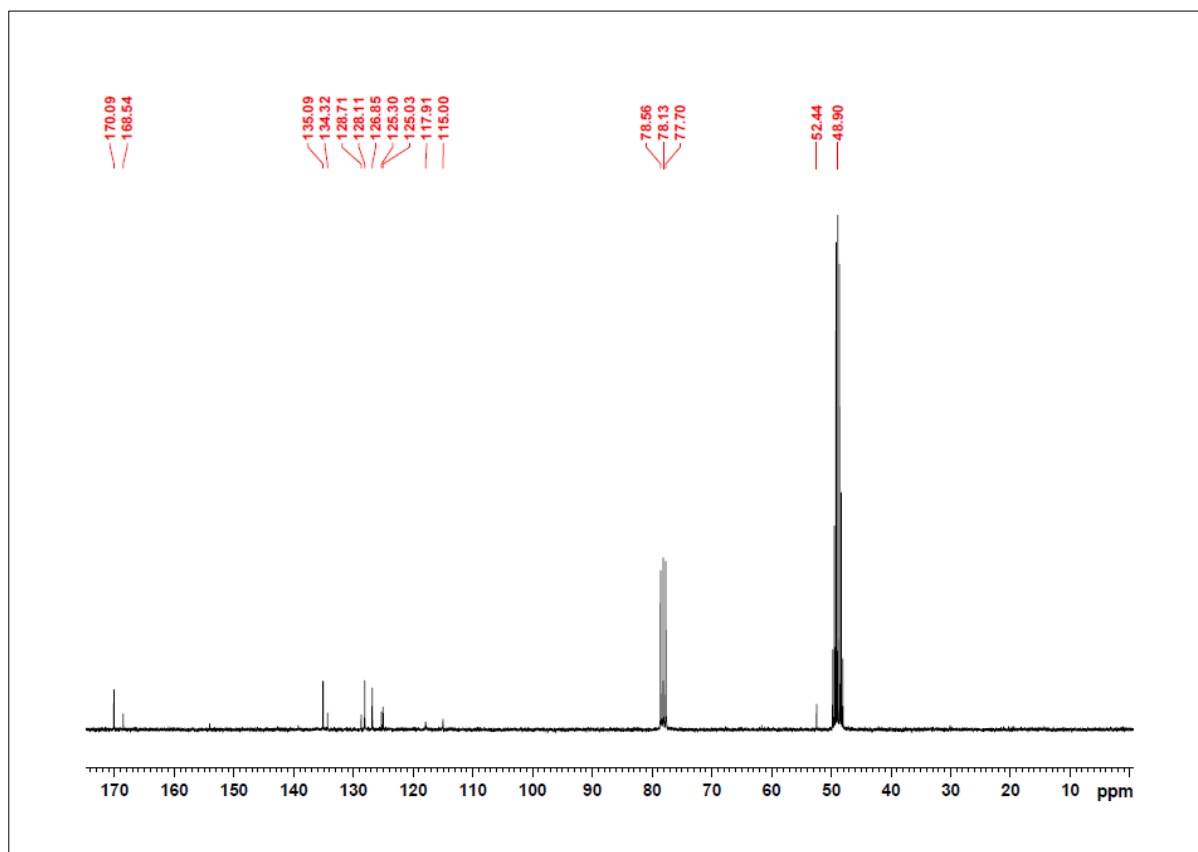


Abbildung 436: ¹³C-NMR (75.4 MHz, CDCl₃:MeOD-*d*₄ = 1:2): Methyl 2-(4-(2,5-dioxo-2H-pyrrol-1-(5H)-yl)-phenyl)-1H-benzo[*d*]imidazol-5-carboxylat 171.

5.4 Signaltransduktionsexperimente mit den Rezeptoren 66/83 und 67

▪ Präparation der Liposomenlösungen

Zur Präparation der Liposomen wurde als Liposomenmatrixmaterial 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (16:0) (**DPPC**, MW = 734.04 g/mol, $T_C = 41\text{ °C}$) und 1,2-Dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (14:0) (**DMPC**, MW = 677.90 g/mol, $T_C = 23\text{ °C}$) verwendet. Je 250 mg DPPC bzw. DMPC wurden zur Herstellung von Stammlösungen in je 25 mL Chloroform gelöst und bei -18 °C gelagert ($c(\text{DPPC}) = 13.62\text{ mmol/L}$, $c(\text{DMPC}) = 14.76\text{ mmol/L}$). Für die Präparation unilamellarer Liposomen wurden Lipidlösungen geringerer Konzentration ($c = 2\text{ mmol/L}$) verwendet und bei Bedarf aus den Stammlösungen hergestellt.

▪ Präparation der Stammlösungen von 66 und 67

Zur Präparation 10^{-4} molarer Stammlösungen der Transmembranbausteine **66** und **67** wurden 17.9 mg ($1.171 \cdot 10^{-5}\text{ mol}$) **66** in 1.171 mL $\text{CH}_3\text{Cl}/\text{MeOH} = 9:1$ und 26.13 mg ($1.77 \cdot 10^{-5}\text{ mol}$) **67** in 1.771 mL $\text{CH}_3\text{Cl}/\text{MeOH} = 9:1$ gelöst. Aus diesen je 10^{-2} molaren Lösungen wurden über eine Verdünnungsreihe die 10^{-4} molaren Stammlösungen erhalten (Lösungsmittel: Chloroform/MeOH = 9:1). Die Stammlösungen wurden bei -18 °C gelagert.

▪ Liposomenpräparation

Die Herstellung der mit **66** und **67** dotierten unilamellaren Liposomen (LUV's) erfolgte nach folgender Vorschrift:

Die Liposomenlösung der unterschiedlichen Phosphatidylcholin-Mischungen wurde entsprechend Tabelle 6 hergestellt, so dass sich eine resultierende Gesamtkonzentration $c(\text{DMPC}/\text{DPPC}) = 2\text{ mmol/L}$ und ein Gesamtvolumen von 1000 μL ergibt.

Tabelle 6: Präparation der Liposomenmischungen.

Verhältnis DMPC:DPPC	V(DMPC)/[μL]	Konz.(DMPC)/[mol/L]	V(DPPC)/[μL]	Konz.(DPPC)/[mol/L]
0:100	0	0	1000	2×10^{-3}
25:75	250	0.5×10^{-3}	750	1.5×10^{-3}
50:50	500	1.0×10^{-3}	500	1.0×10^{-3}
75:25	750	1.5×10^{-3}	250	0.5×10^{-3}
90:10	900	1.8×10^{-3}	100	0.2×10^{-3}
100:0	1000	2×10^{-3}	0	0

Die für die entsprechende Dotierung verwendete Menge an Transmembranbaustein-Stammlösung kann aus Tabelle 7 entnommen werden. Die Volumenangaben in Tabelle 7 beziehen sich auf die jeweils eingesetzte Menge an Donor- bzw. Akzeptorbaustein.

Tabelle 7: Eingesetzte Menge an Stammlösung entsprechend einer x-%igen Dotierung.

Dotierung/[%]	Konz.(c)/[mol/L]	Stoffmenge (n)/[mol]	V(Stamm)/[μL]
0.5	1x10E-5	1x10E-8	100
1.00	2x10E-5	2x10E-8	200
1.50	3x10E-5	3x10E-8	300
2.00	4x10E-5	4x10E-8	400
2.50	5x10E-5	5x10E-8	500
3.00	6x10E-5	6x10E-8	600
3.50	7x10E-5	7x10E-8	700
4.00	8x10E-5	8x10E-8	800
4.50	9x10E-5	9x10E-8	900
5.00	1x10E-4	1x10E-7	1000

Beispiel:

Zur Herstellung unilamellarer Liposomen, bestehend aus einer Lipidmatrix mit einem Mischungsverhältnis DMPC/DPPC = 75 % - 25 % und einer Dotierung mit je 2.5 % **66** und 2.5 % **67** wurden 750 μL DMPC-Stammlösung, 250 μL DPPC-Stammlösung, 500 μL **66**-Stammlösung und 500 μL **67**-Stammlösung in einen 10 mL Rundkolben gegeben. Das Lösungsmittelgemisch wurde am Rotationsverdampfer bis zu Trockne eingengt und anschließend gefriergetrocknet. Hierzu wurde der Kolben 10 min in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend min. 4 h lyophilisiert. Die resultierenden Filme, bestehend aus den Phosphatidylcholinen und den Transmembranbausteinen **66** und **67** wurden anschließend in 1 mL MES-Puffer (375 mM, pH = 5.5) aufgenommen und für min. 1 min gevortext. Bei Liposomen mit hohem DPPC-Anteil wird die trübe Suspension unter ständigem Schwenken im Wasserbad über die Phasenübergangstemperatur erwärmt (41 °C). Die Liposomenlösung wurde mit Hilfe des LiposoFast Basic/Stabilisator®-Systems zur Herstellung unilamellarer Liposomen min. 19 mal (ungerade Extrusionzyklen) durch eine 200 nm Polycarbonatmembran extrudiert. Falls eine Membran während des Extrusionsvorgangs reißt (spürbar durch plötzlichen Widerstandsverlust) wird die bereits extrudierte Suspension verworfen. Die so erhaltene wässrige unilamellare Liposomenlösung (c = 2 mmol/L, Gesamtdotierung: 5 %) wurde zur Vermessung am Fluoreszenzspektrometer bereitgehalten.

Die Präparation der Liposomen mit anderen Lipidmischungsverhältnissen und unterschiedlichen Dotierungen erfolgte in analoger Weise.

▪ Fluoreszenzmessungen

300 μL der wässrigen Liposomenlösung wurden in eine Microtiterplatte der Marke *Falcon Black Flat* überführt und die Lösung über einen Zeitraum von min. 60 min equilibriert und gleichzeitig auf 25 °C temperiert. Als Referenz wurde eine Basislinie (300-650 nm) gegen den verwendeten MES-Puffer gemessen. Während der Equilibrierung wurde alle 90 sec ein Übersichtsspektrum (300-650 nm, Bandbreite 2 nm) gemessen und die Intensitätswerte der Emissionsmaxima des FRET-Donors **66** und des FRET-Akzeptors **67** bestimmt ($\lambda_{\text{Ex}} = 280 \text{ nm}$). Nach annähernder Konstanz der Intensitätsmaxima wurden 100 eq. Diethylentriamin trihydrochlorid (DET) zugegeben. Wiederum wurde über einen Zeitraum von min. 60 min alle 90 s ein Übersichtsspektrum gemessen und die Intensitäten der Emissionsmaxima bestimmt. Die Messungen wurden über einen großen Wellenlängenbereich durchgeführt, um die Emissionsmaxima simultan verfolgen und eventuell auftretende Trübungserscheinungen ausschließen zu können.

Des Weiteren wurden zu jeder Messung Kontrollexperimente durchgeführt. Entsprechend der Dotierung wurden der FRET-Donor-Baustein **66** bzw. der FRET-Akzeptor-Baustein **67** jeweils einzeln in die entsprechende Liposomenmatrix eingelagert und die Messung unter identischen Bedingungen durchgeführt.

Im Folgenden sind zu jeder Messreihe folgende Spektren abgebildet:

1. Für die Signaltransduktionsexperimente:

- Die zeitliche Änderung der Emissionsmaxima vor und nach Zugabe des Botenstoffs DET.
- Die Emissionsspektren vor und nach Zugabe des Botenstoffs DET.
- Die Änderung der relativen Intensitäten I_{rel} vor und nach Zugabe des Botenstoffs DET.
- Die, um die Dansylemission bereinigten Emissionsspektren ($\lambda_{\text{Ex}} = 280 \text{ nm}$) vor und nach Zugabe des Botenstoffs DET.
- Die Änderung der relativen Intensitäten I_{rel} (bereinigt um die Dansylemission ($\lambda_{\text{Ex}} = 280 \text{ nm}$)).

2. Für die Kontrollexperimente:

- Die zeitliche Änderung der Emissionsmaxima des Donors **66** bzw. des Akzeptors **67** vor und nach Zugabe des Botenstoffs DET.
 - Die Emissionsspektren des Donors **66** bzw. des Akzeptors **67** vor und nach Zugabe des Botenstoffs DET.
-

- UV-Vis- und Fluoreszenzspektren der Rezeptoren 66/83 und 67 in Lösung

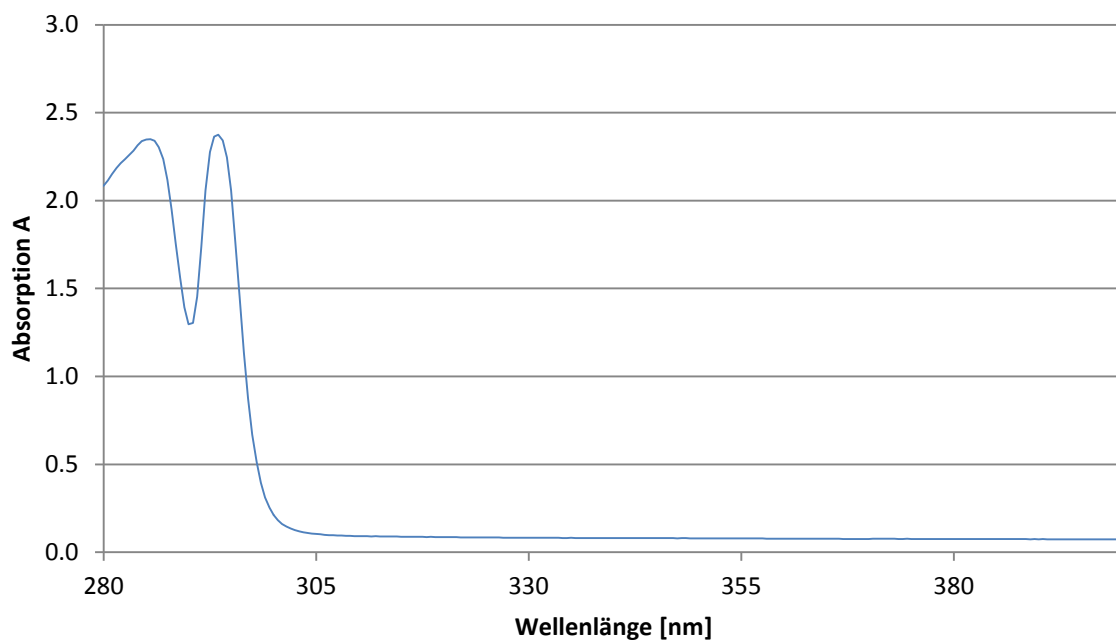


Abbildung 437: Absorptionsspektrum von 83 ($c = 5 \times 10^{-5}$ mol/L) in MeOH.

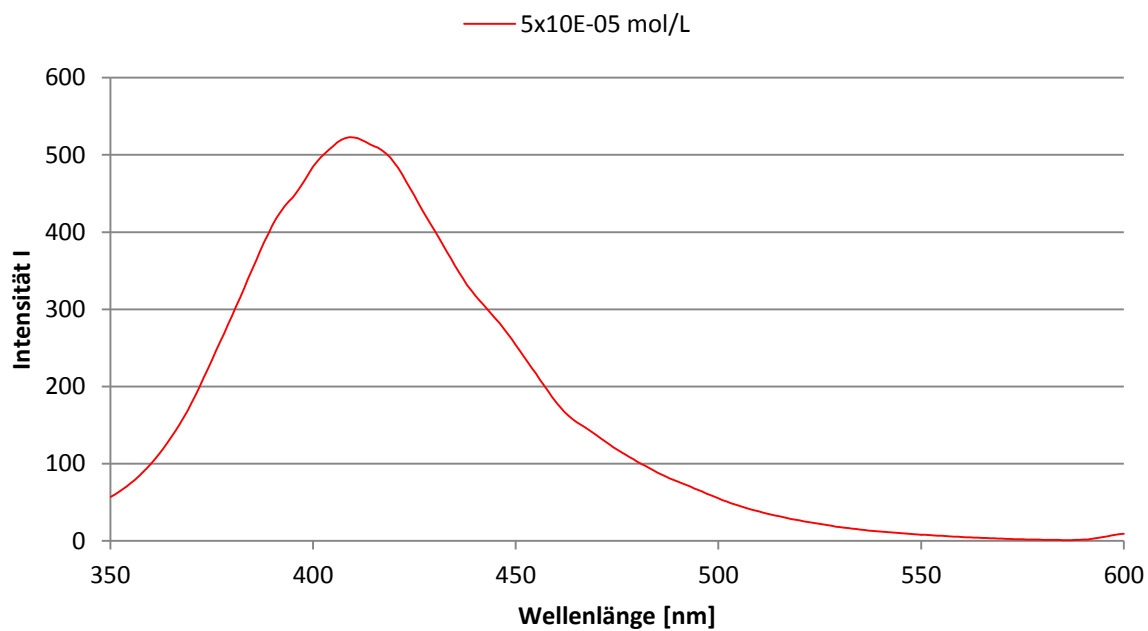


Abbildung 438: Emissionsspektrum von 83 ($c = 5 \times 10^{-5}$ mol/L) in MeOH ($\lambda_{\text{Ex}} = 295$ nm).

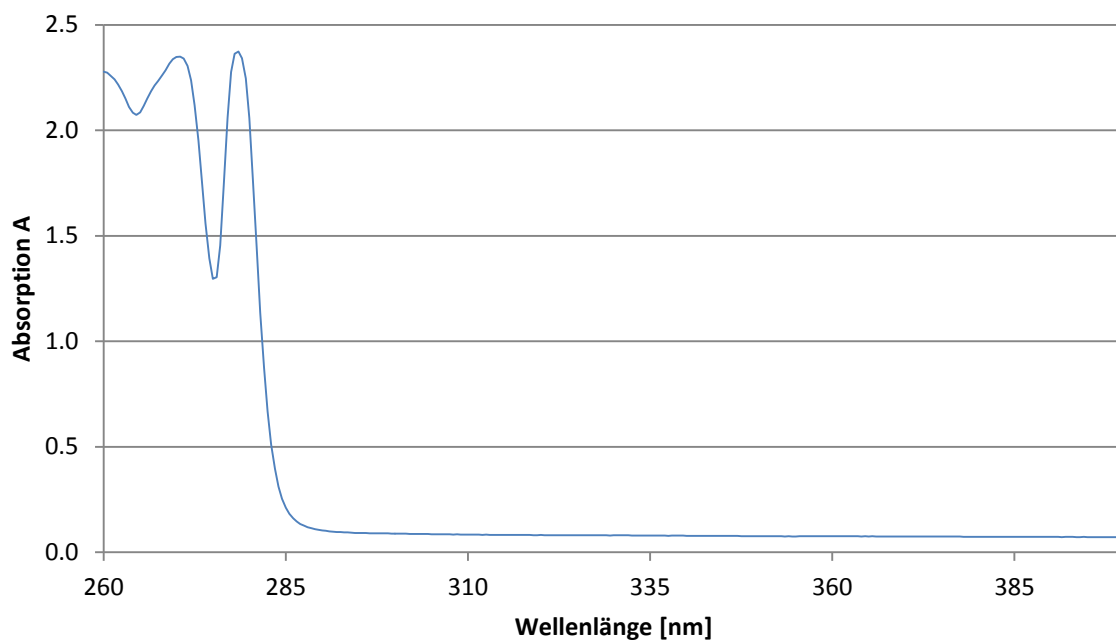


Abbildung 439: Absorptionsspektrum von 66 ($c = 5 \times 10^{-5}$ mol/L) in MeOH.

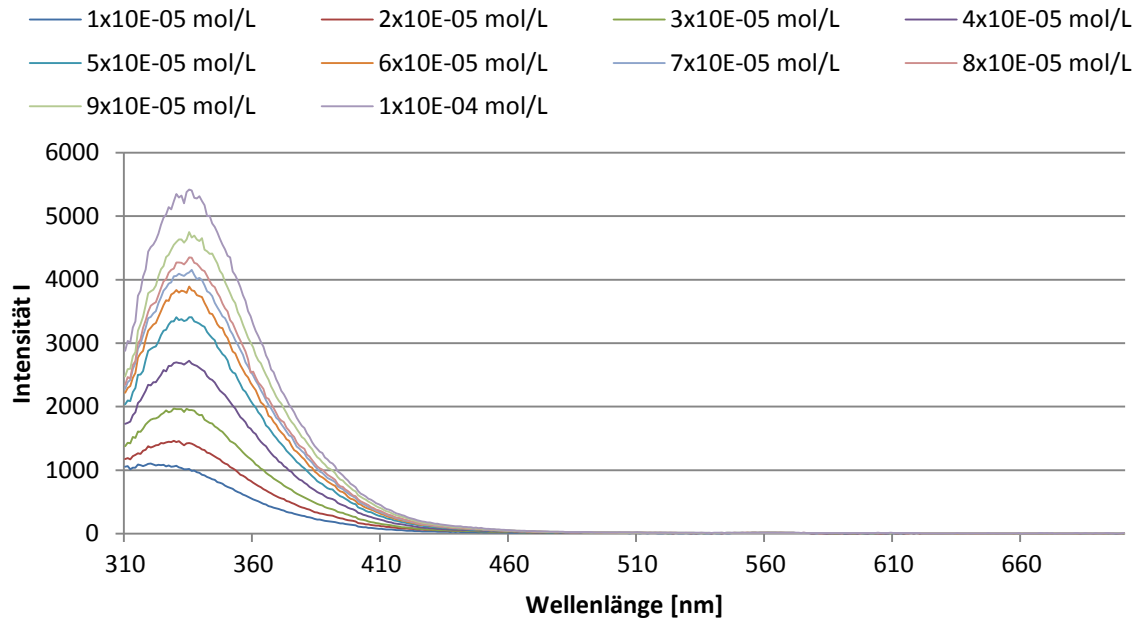


Abbildung 440: Emissionsspektren von 66 ($c = 10^{-5}$ mol/L - 10^{-4} mol/L) in MeOH ($\lambda_{\text{Ex}} = 280$ nm).

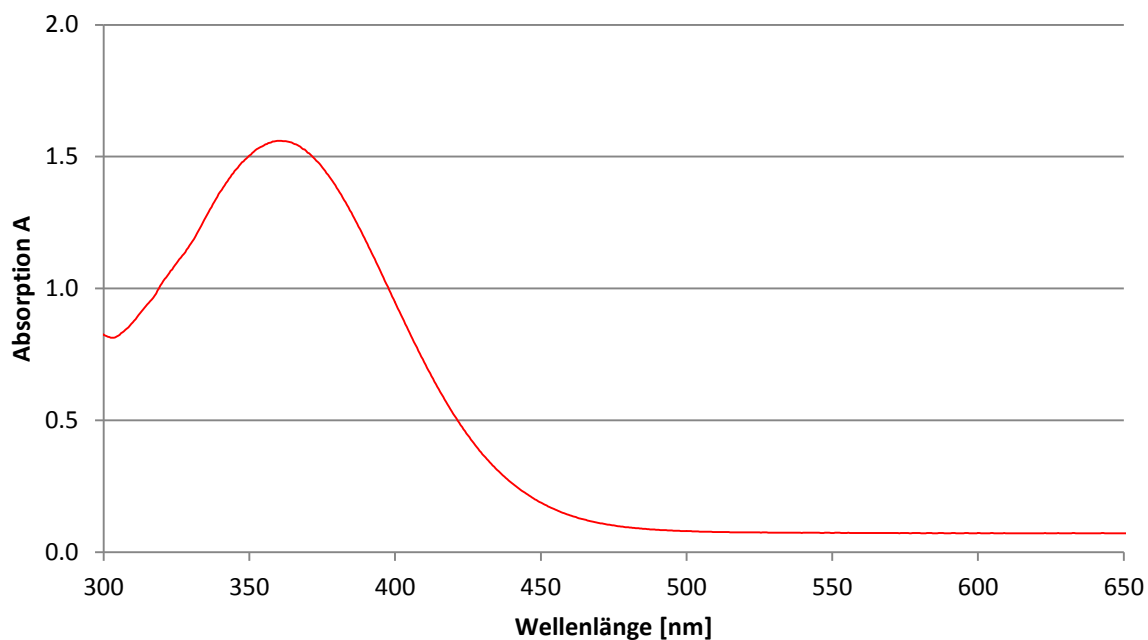


Abbildung 441: Absorptionsspektrum von 67 ($c = 5 \times 10^{-5}$ mol/L) in MeOH.

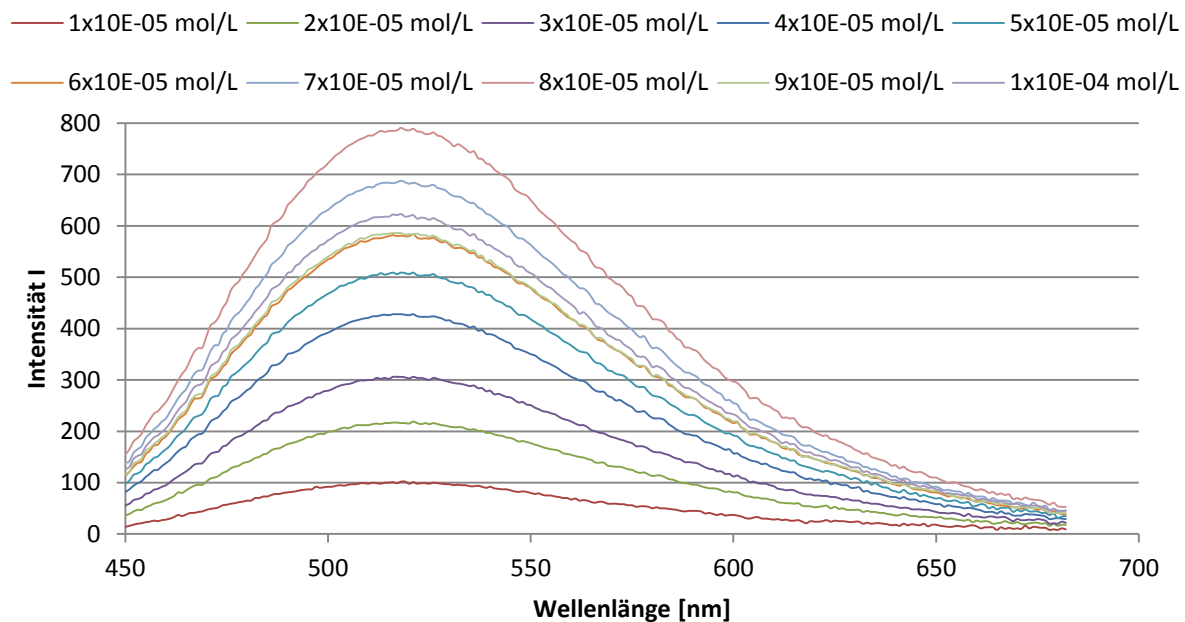


Abbildung 442: Emissionsspektren von 67 ($c = 10^{-5}$ mol/L - 10^{-4} mol/L) in MeOH ($\lambda_{\text{Ex}} = 330$ nm).

5.4.1 Signaltransduktionsexperimente mit DPPC-Liposomen

- Dotierung mit je 2.5 % der Transmembranbausteine 83 und 67

1. Signaltransduktionsexperimente:

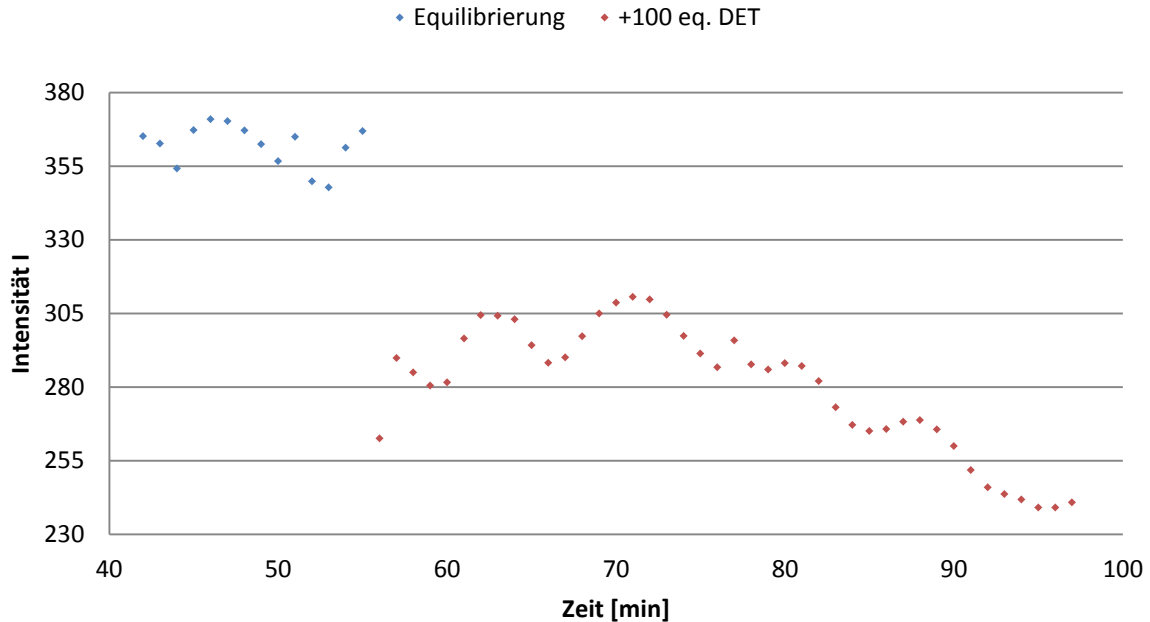


Abbildung 443: Zeitliche Änderung der Fluoreszenzintensität I von 83 vor und nach Zugabe von 100 eq. DET (5 % in DPPC).

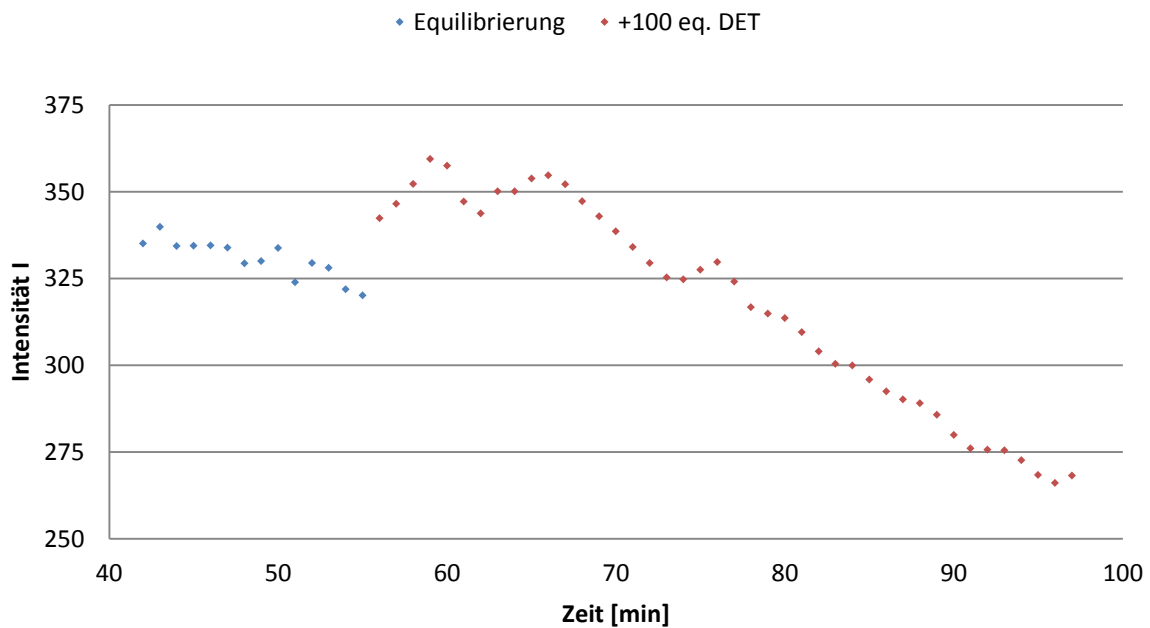


Abbildung 444: Zeitliche Änderung der Fluoreszenzintensität I von 67 vor und nach Zugabe von 100 eq. DET (5 % in DPPC).

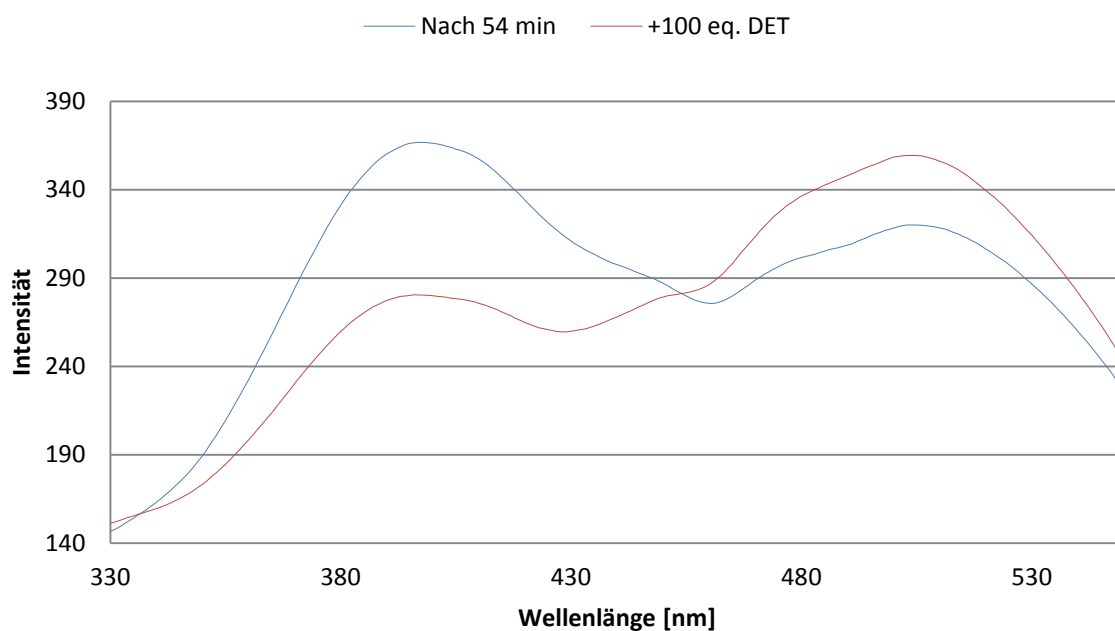


Abbildung 445: Emissionsspektren vor und nach Zugabe von 100 eq. DET (5 % in DPPC).

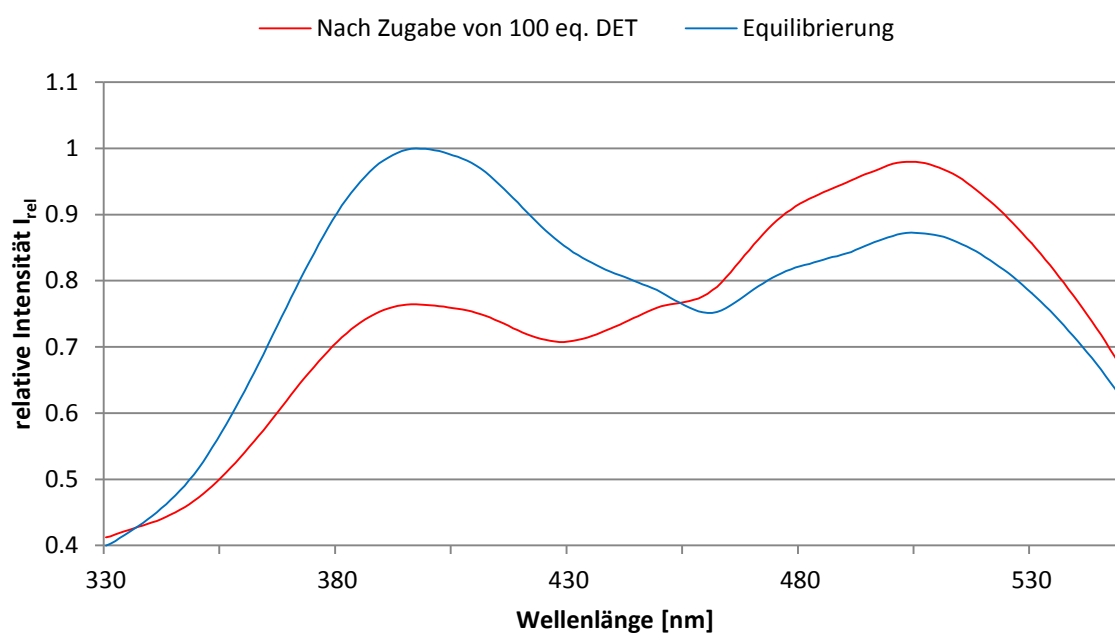


Abbildung 446: Änderung der relativen Intensitäten I_{rel} nach Zugabe von 100 eq. DET (5 % in DPPC).

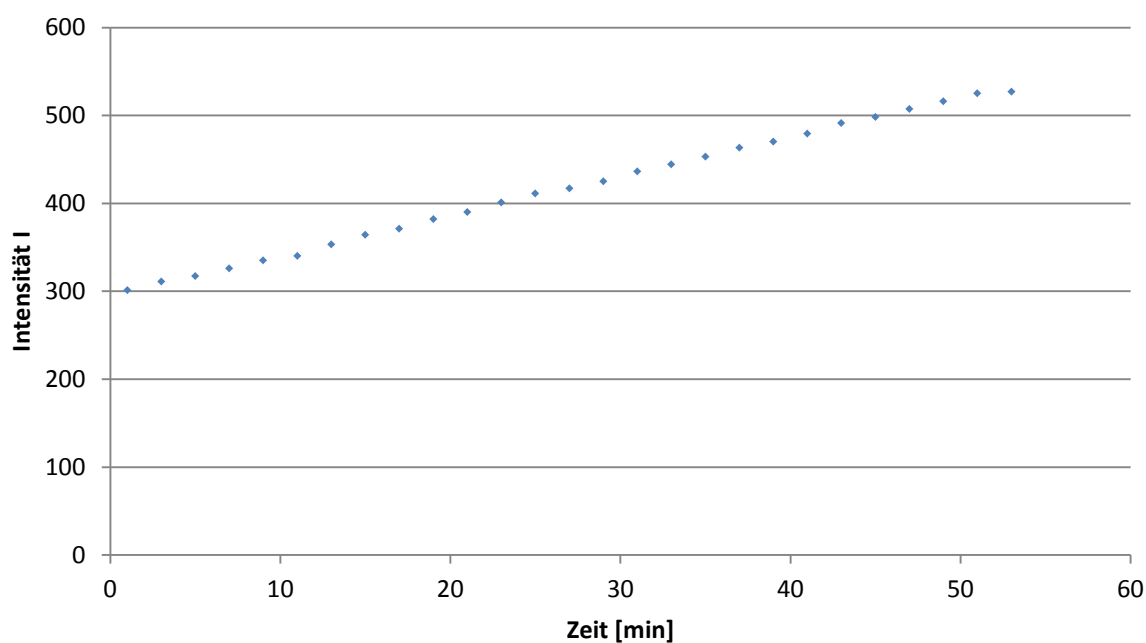
2. Kontrollexperimente:

Abbildung 447: Zeitliche Änderung der Donor-Fluoreszenzintensität I vor und nach Zugabe von 100 eq. DET (2.5 % in DPPC).

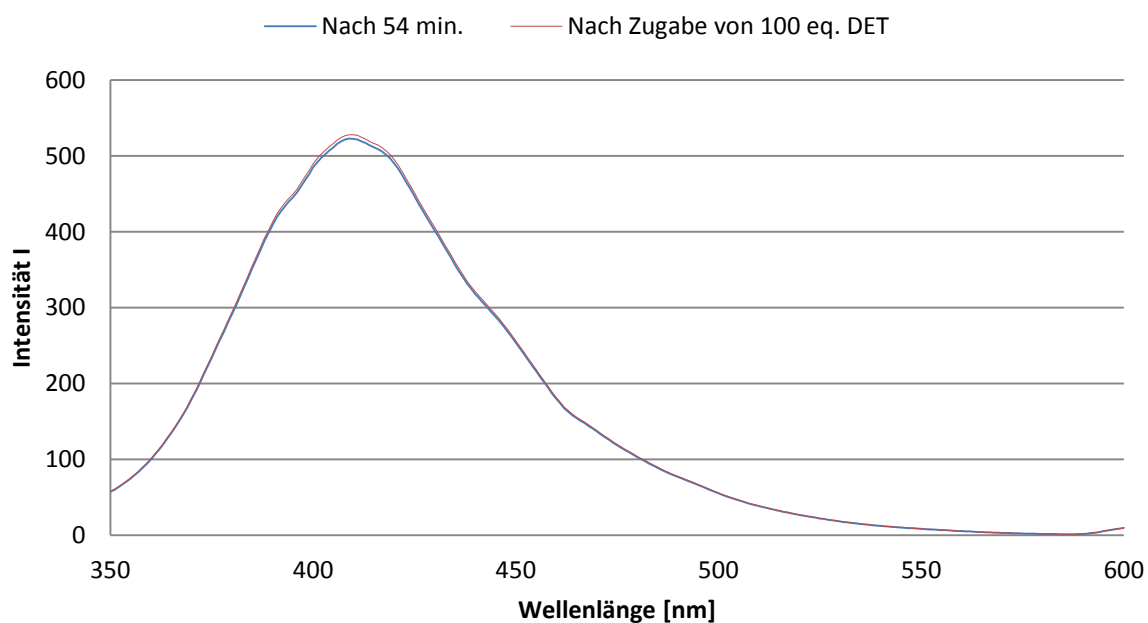


Abbildung 448: Emissionsspektren des FRET-Donors 83 vor und nach Zugabe von 100 eq. DET (2.5 % in DPPC).

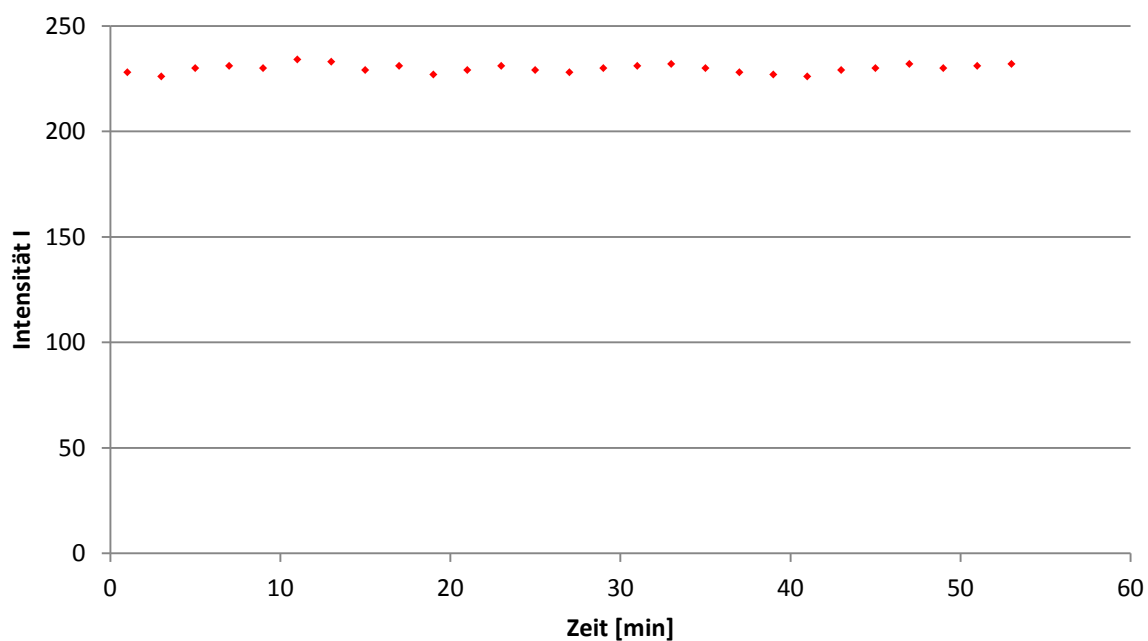


Abbildung 449: Zeitliche Änderung der Akzeptor-Fluoreszenzintensität I vor und nach Zugabe von 100 eq. DET (2.5 % in DPPC).

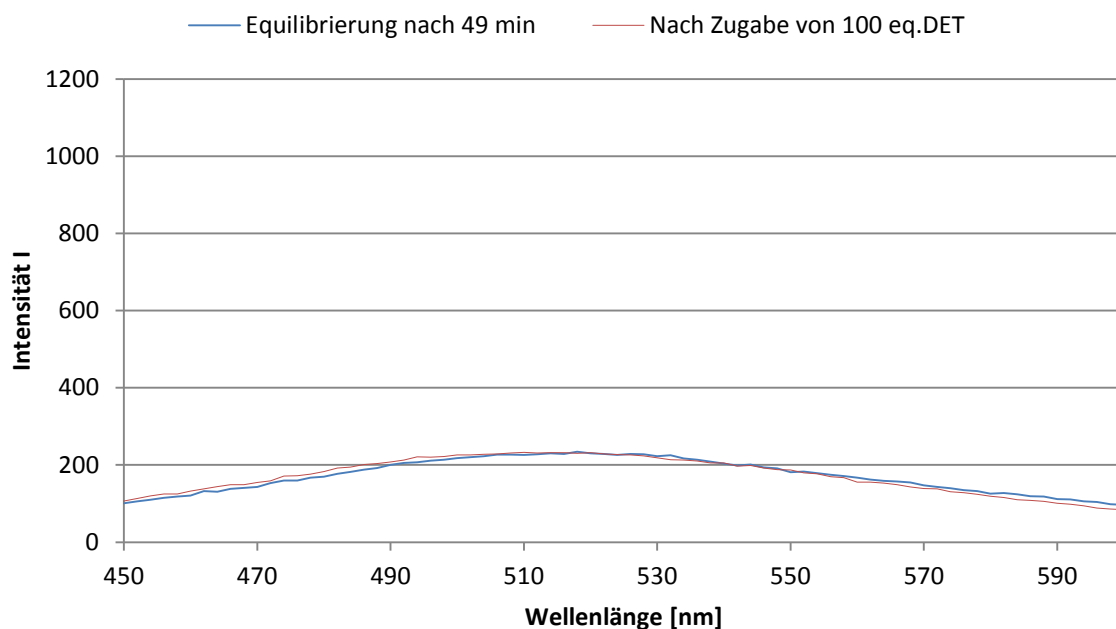


Abbildung 450: Emissionsspektren des FRET-Akzeptors 67 vor und nach Zugabe von 100 eq. DET (2.5 % in DPPC).

▪ **Dotierung mit je 2.5 % der Transmembranbausteine 66 und 67**

1. Signaltransduktionsexperimente:

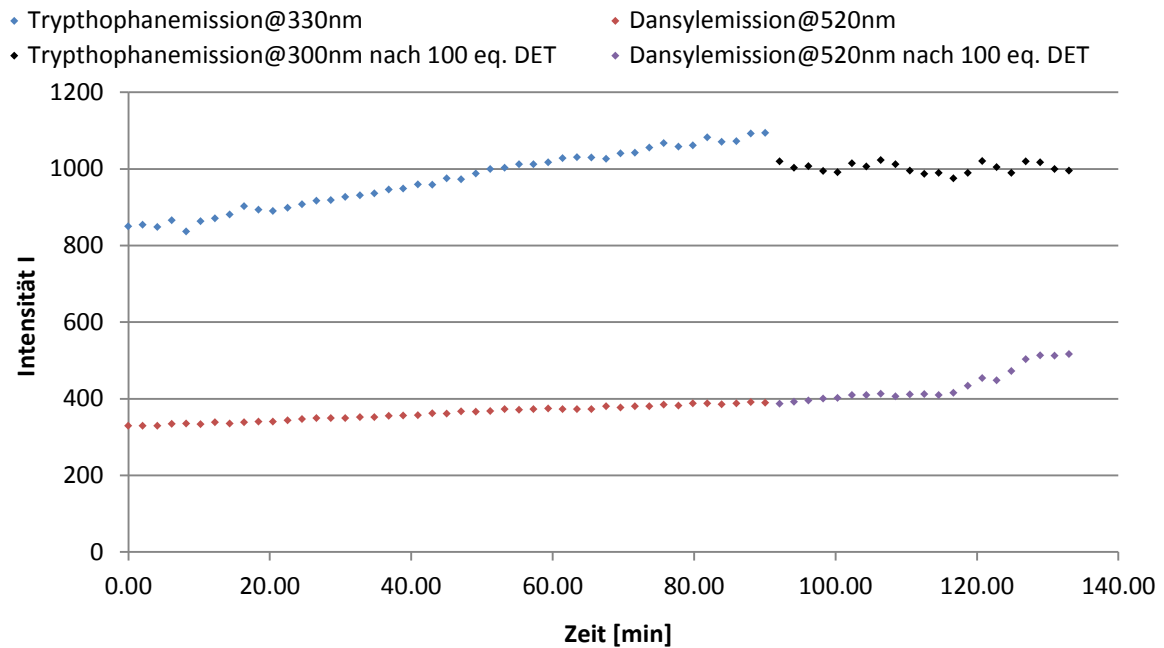


Abbildung 451: Zeitliche Änderung der Fluoreszenzintensität I vor und nach Zugabe von 100 eq. DET (5 % in DPPC).

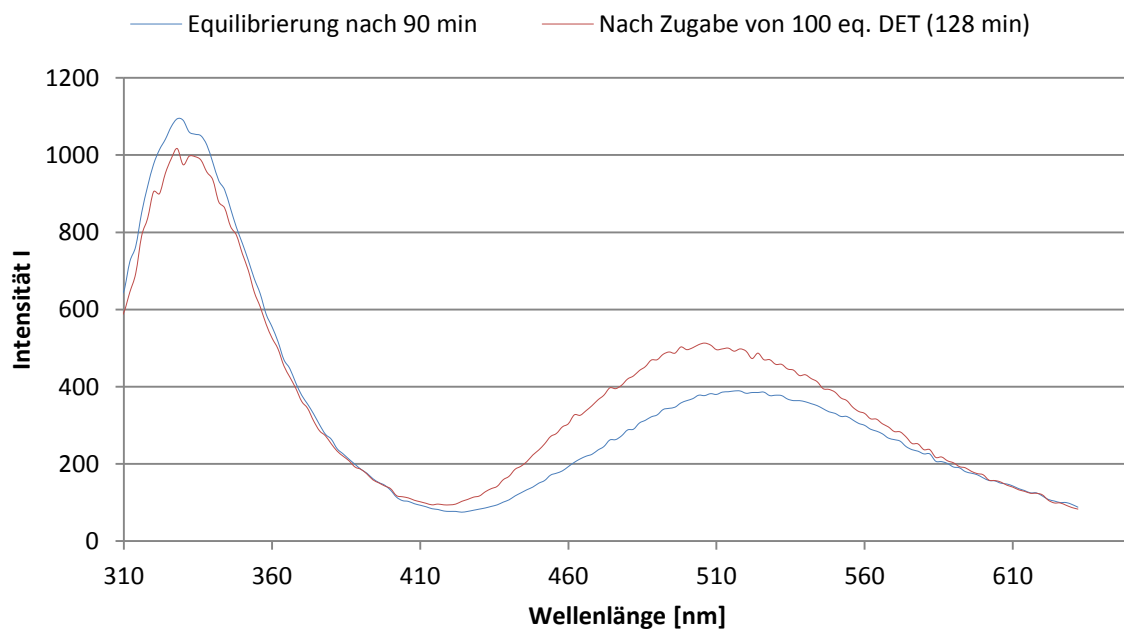


Abbildung 452: Emissionsspektren vor und nach Zugabe von 100 eq. DET (5 % in DPPC).

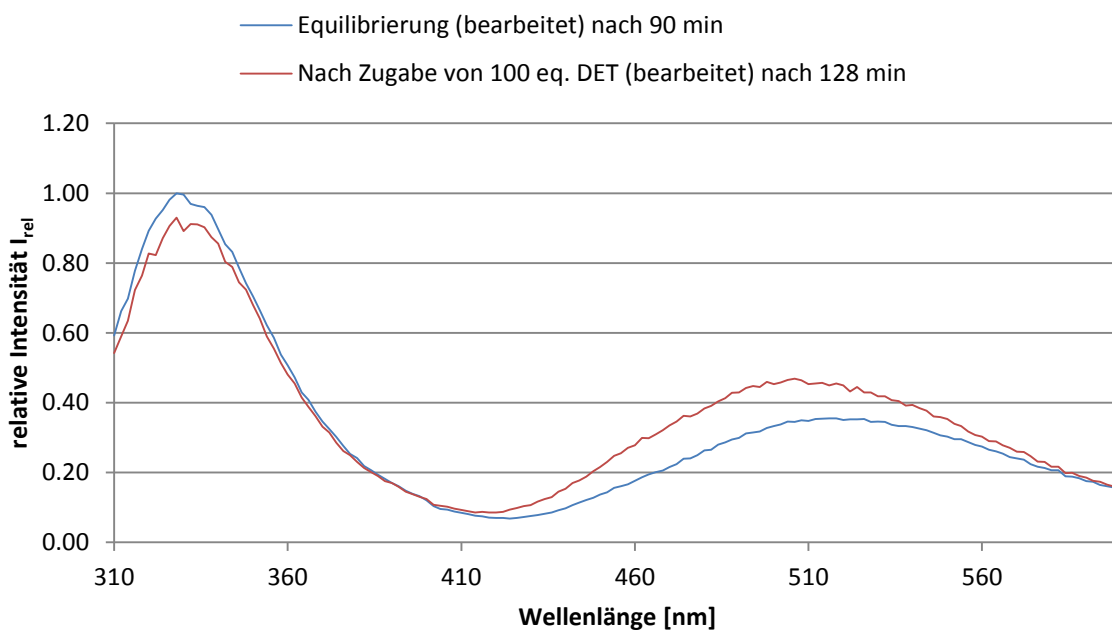


Abbildung 453: Änderung der relativen Intensitäten I_{rel} nach Zugabe von 100 eq. DET (5 % in DPPC).

Tabelle 8: Prozentuale Änderung der relativen Intensitäten I_{rel} nach Zugabe von 100 eq. DET (5 % in DPPC).

	Vor Zugabe von 100 eq. DET			Nach Zugabe von 100 eq. DET				
	$\lambda_{max}(Em)/[nm]$	abs. Intensität	rel. Intensität	$\lambda_{max}(Em)/[nm]$	abs. Intensität	rel. Intensität	proz. Änderung	$\Delta\lambda_{max}(Em)/[nm]$
Tryptophan	328	1094	1	328	1017	0.93	-7%	0
Dansyl	520	389	0.356	508	513	0.469	+11%	-12

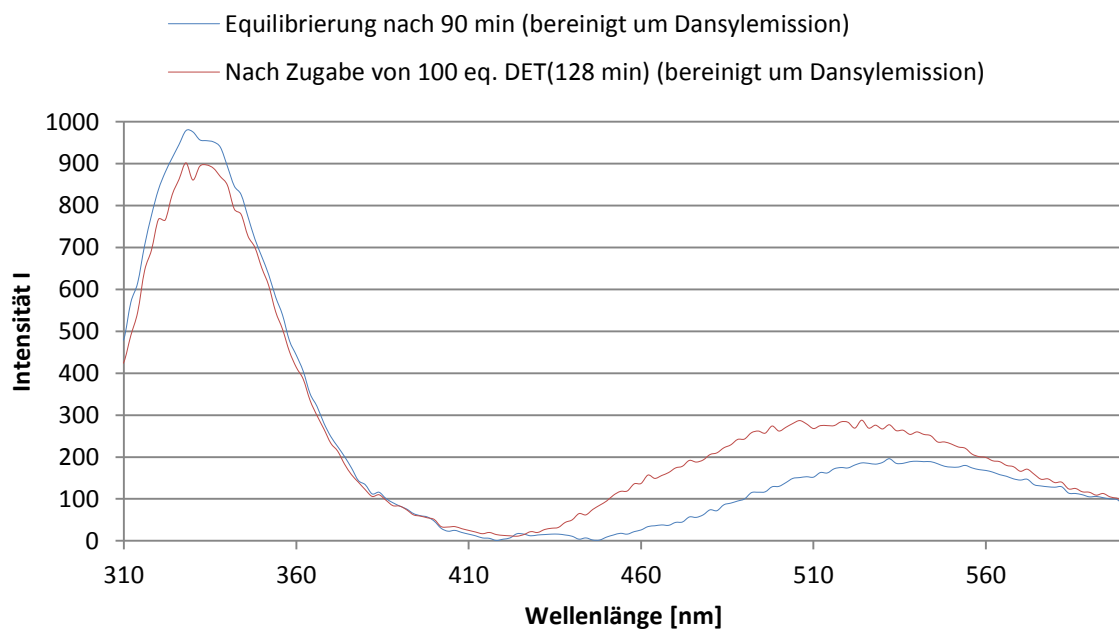


Abbildung 454: Um Dansylemission bereinigte Emissionsspektren ($\lambda_{ex} = 280 \text{ nm}$) vor und nach Zugabe von 100 eq. DET (5 % in DPPC).

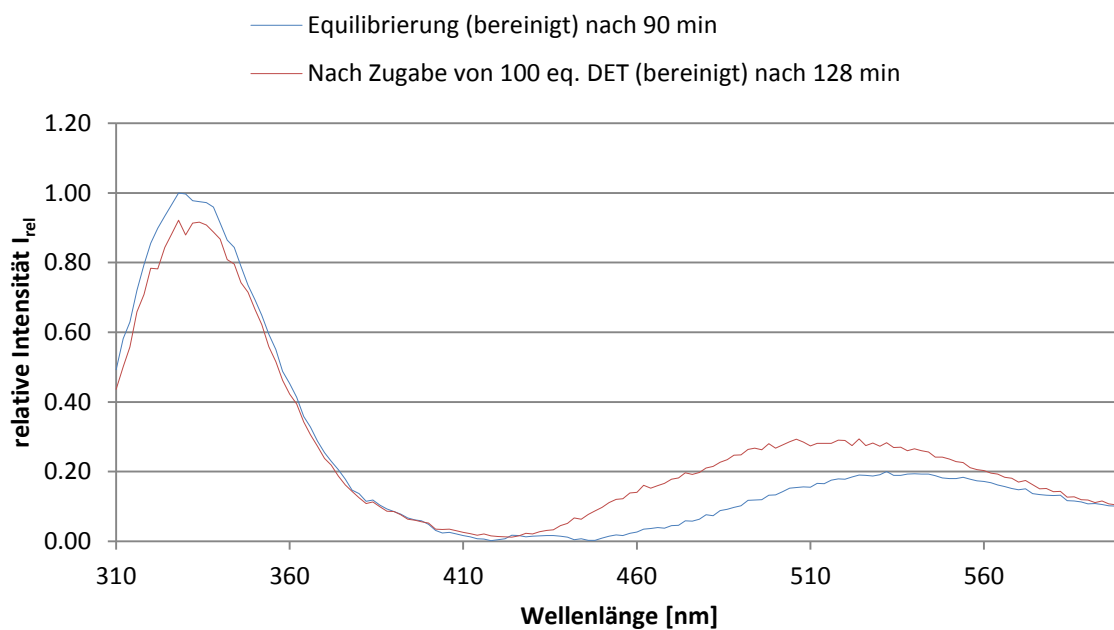


Abbildung 455: Änderung der relativen Intensitäten I_{rel} nach Zugabe von 100 eq. DET (um Dansylemission ($\lambda_{Ex} = 280$ nm) bereinigt) (5 % in DPPC).

	Vor Zugabe von 100 eq. DET			Nach Zugabe von 100 eq. DET				
	λ_{max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität	λ_{max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität	proz. Änderung	$\Delta\lambda_{max}$ (Em)/[nm]
Tryptophan	328	979	1	328	902	0.921	-7.9%	0
Dansyl	520	175	0.179	508	508	0.285	+10.6%	-12

Tabelle 9: Änderung der bereinigten relativen Intensitäten I_{rel} nach Zugabe von 100 eq. DET (5 % in DPPC).

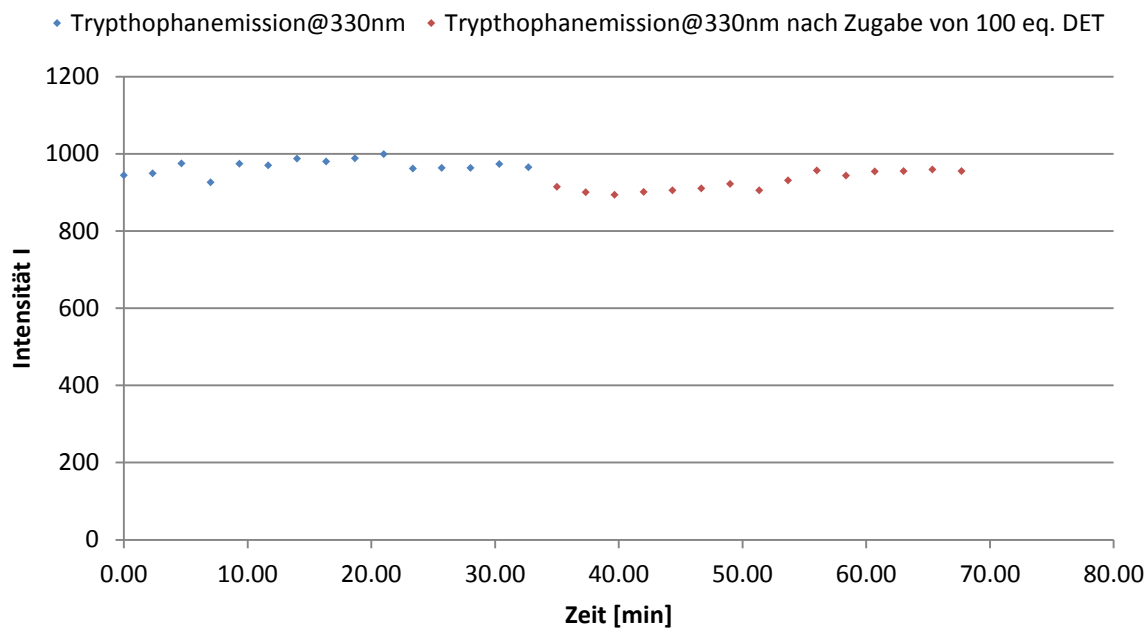
2. Kontrollexperimente:

Abbildung 456: Zeitliche Änderung der Donor-Fluoreszenzintensität I vor und nach Zugabe von 100 eq. DET (2.5 % in DPPC).

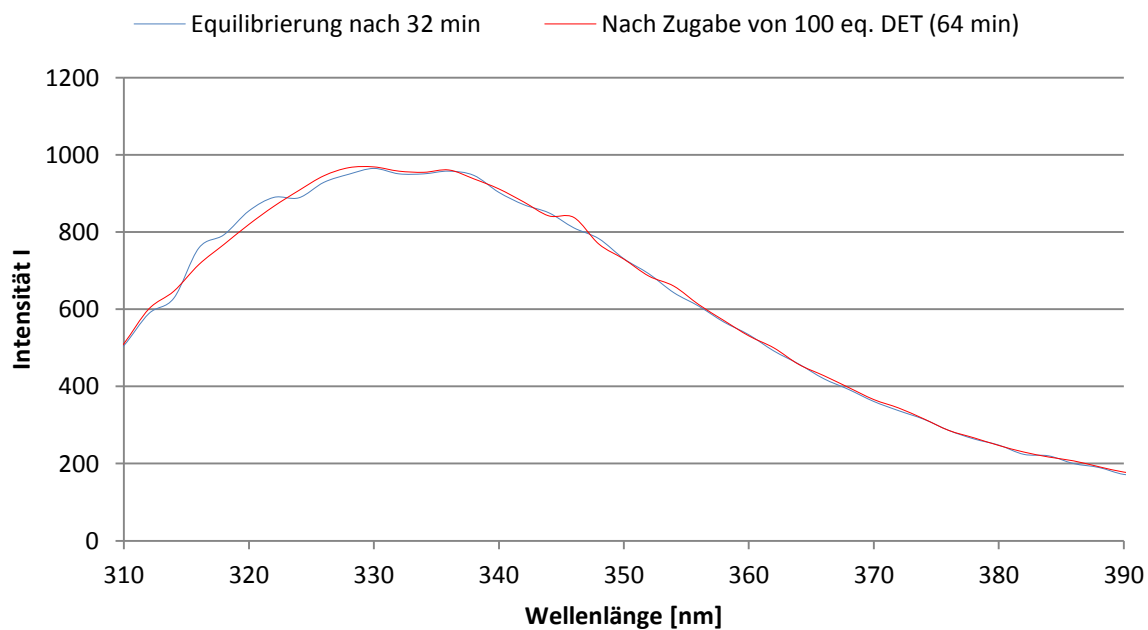


Abbildung 457: Emissionsspektren des FRET-Donors 67 vor und nach Zugabe von 100 eq. DET (2.5 % in DPPC).

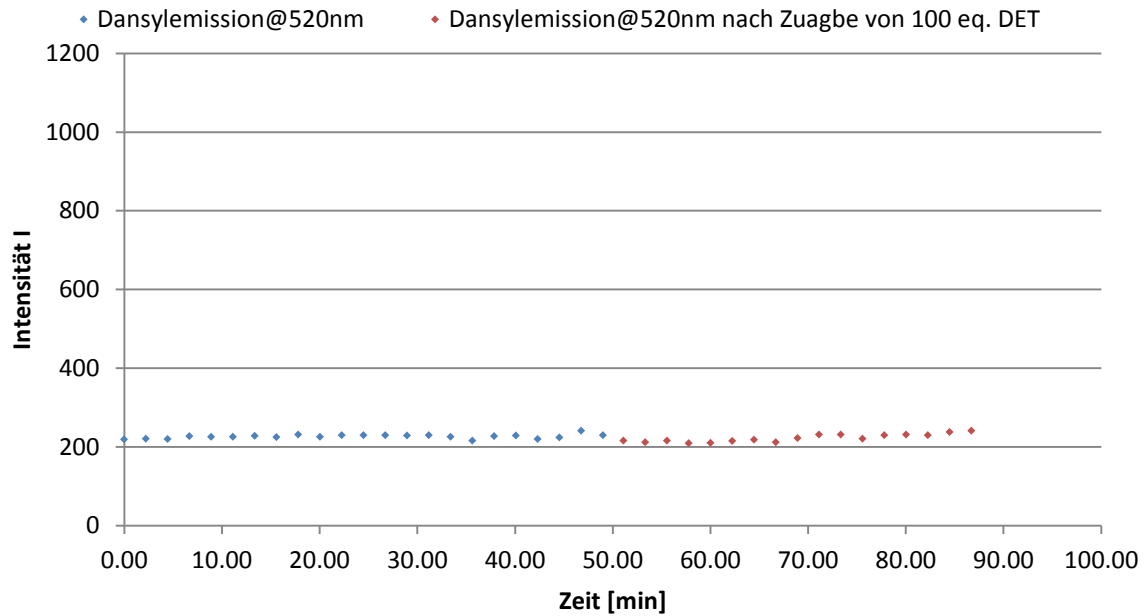


Abbildung 458: Zeitliche Änderung der Akzeptor-Fluoreszenzintensität I vor und nach Zugabe von 100 eq. DET (2.5 % in DPPC).

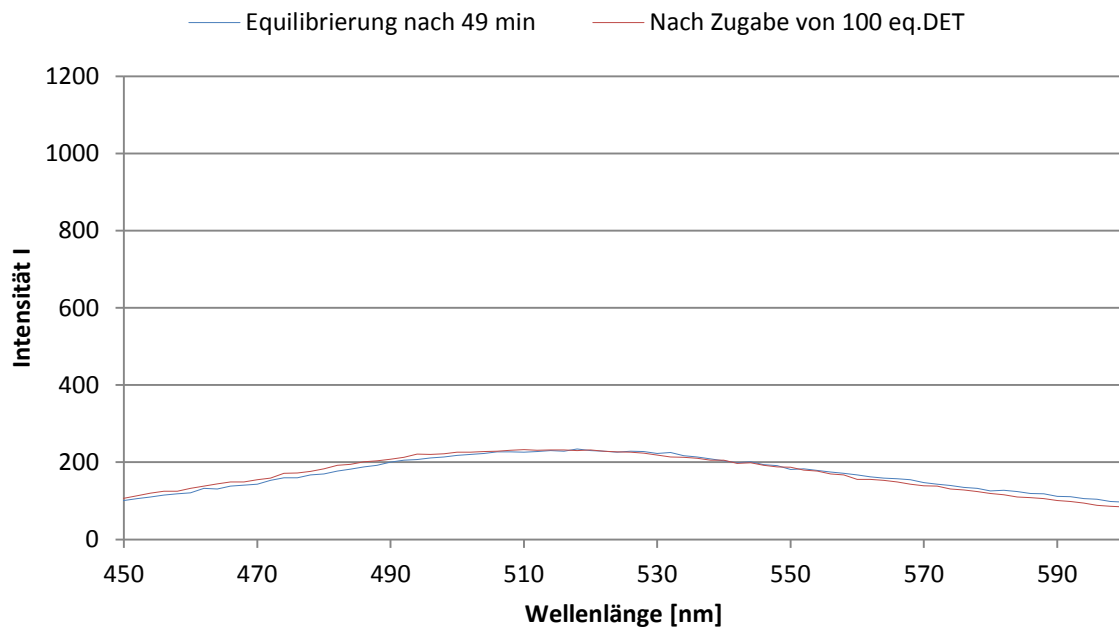


Abbildung 459: Emissionspektren des FRET-Akzeptors 67 vor und nach Zugabe von 100 eq. DET (2.5 % in DPPC).

▪ **Dotierung mit je 2 % der Transmembranbausteine 66 und 67**

1. Signaltransduktionsexperimente:

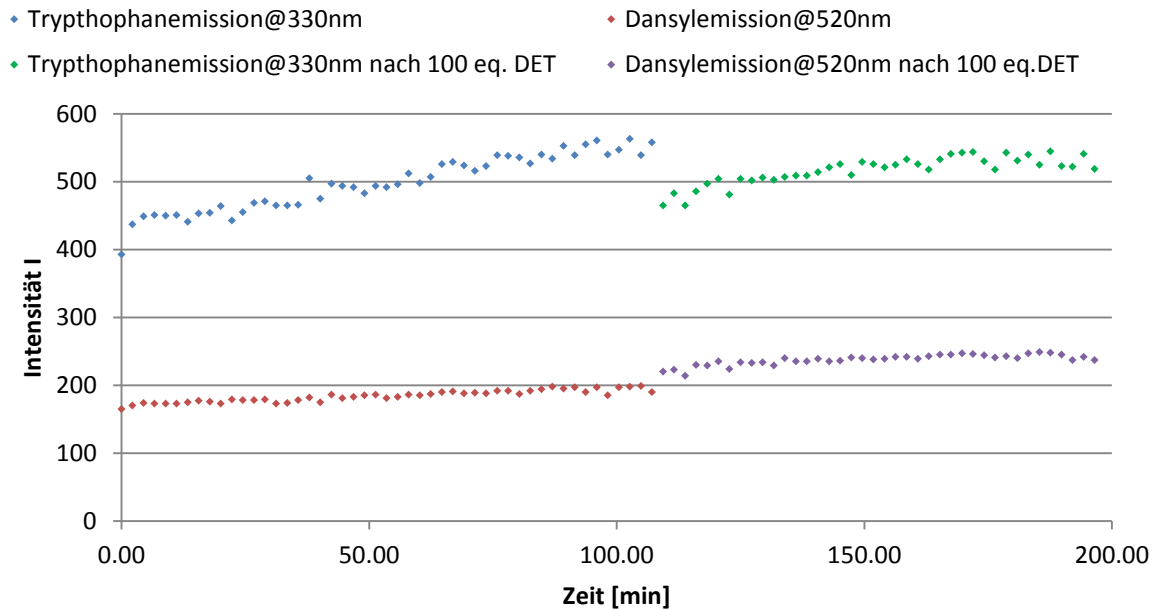


Abbildung 460: Zeitliche Änderung der Fluoreszenzintensität I vor und nach Zugabe von 100 eq. DET (4 % in DPPC).

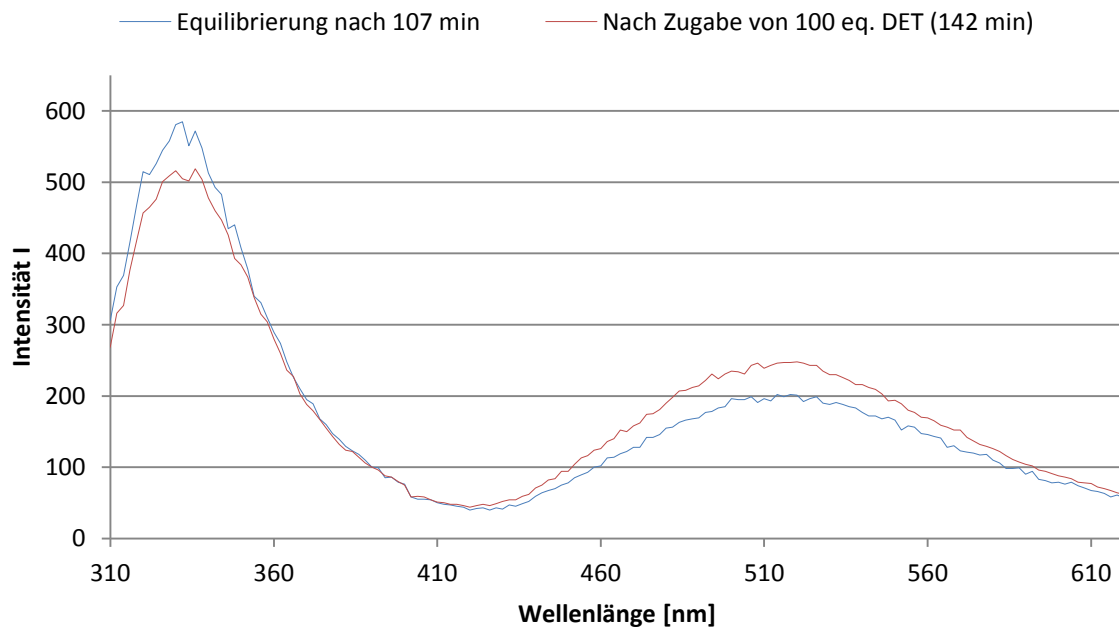


Abbildung 461: Emissionsspektren vor und nach Zugabe von 100 eq. DET (4 % in DPPC).

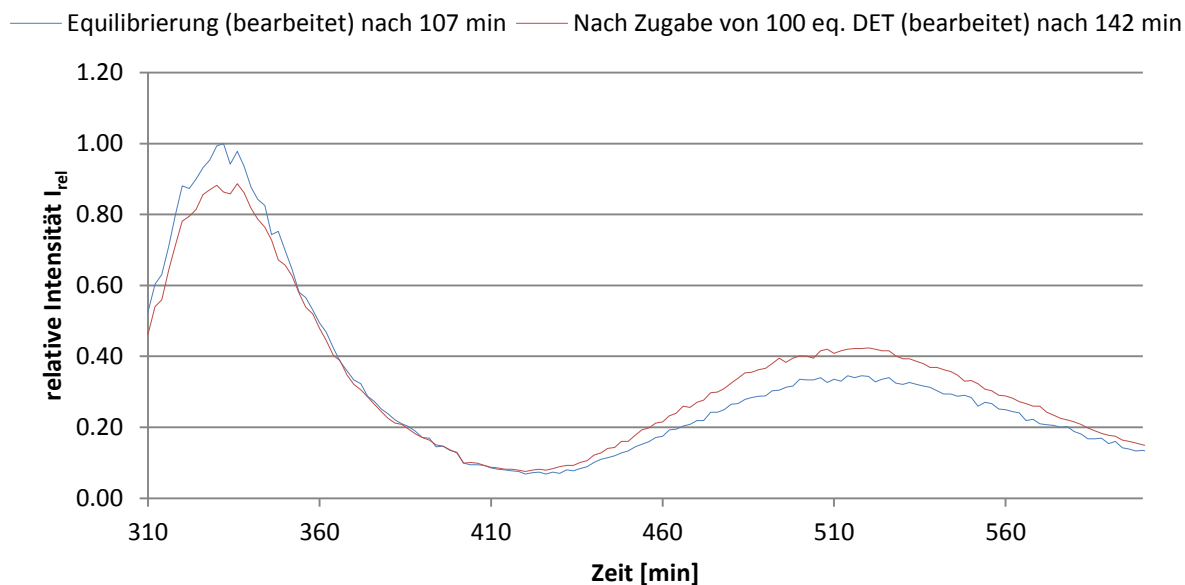


Abbildung 462: Änderung der relativen Intensitäten I_{rel} nach Zugabe von 100 eq. DET (4 % in DPPC).

Tabelle 10: Prozentuale Änderung der relativen Intensitäten I_{rel} nach Zugabe von 100 eq. DET (4 % in DPPC).

	Vor Zugabe von 100 eq. DET			Nach Zugabe von 100 eq. DET			proz. Änderung	$\Delta\lambda_{\text{max}}(\text{Em})/[\text{nm}]$
	$\lambda_{\text{max}}(\text{Em})/[\text{nm}]$	abs. Intensität	rel. Intensität	$\lambda_{\text{max}}(\text{Em})/[\text{nm}]$	abs. Intensität	rel. Intensität		
Tryptophan	332	585	1	332	505	0.863	-13.7%	0
Dansyl	520	201	0.344	520	248	0.424	+8%	0

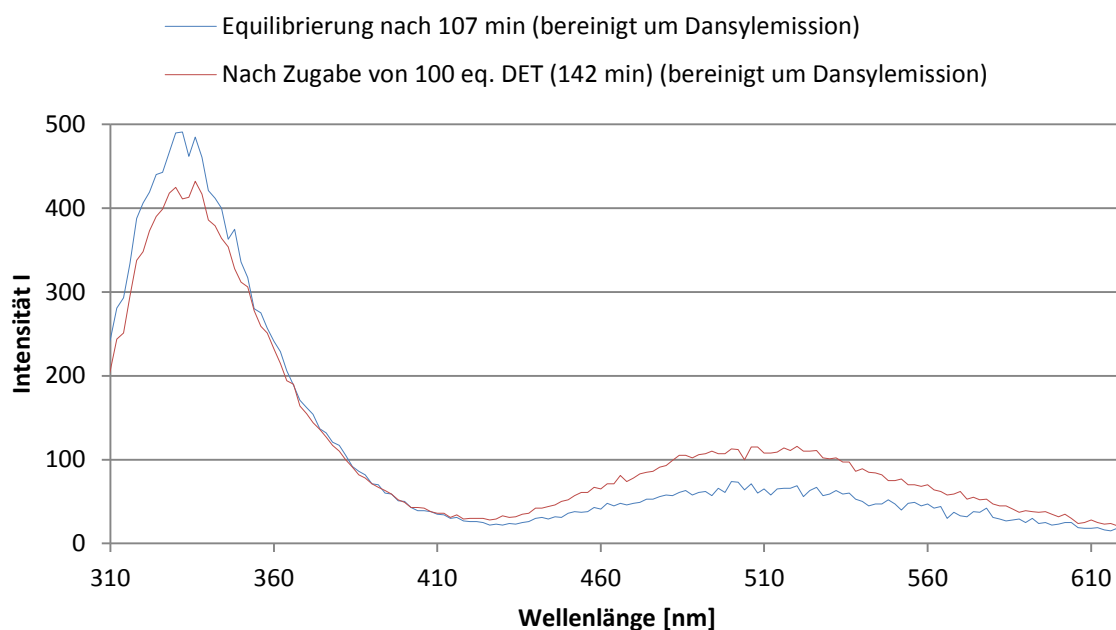


Abbildung 463: Um Dansylemission bereinigte Emissionsspektren ($\lambda_{\text{Ex}} = 280 \text{ nm}$) vor und nach Zugabe von 100 eq. DET (4 % in DPPC).

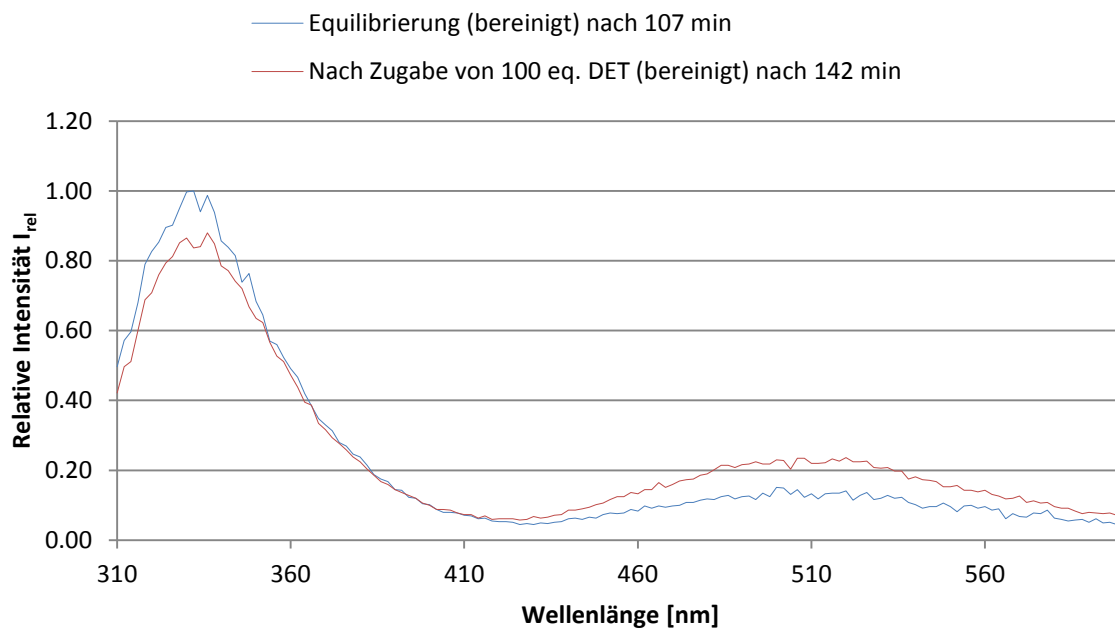


Abbildung 464: Änderung der relativen Intensitäten I_{rel} nach Zugabe von 100 eq. DET (um Dansylemission ($\lambda_{Ex} = 280$ nm) bereinigt) (4 % in DPPC).

Tabelle 11: Änderung der bereinigten relativen Intensitäten I_{rel} nach Zugabe von 100 eq. DET (4 % in DPPC).

	Vor Zugabe von 100 eq. DET			Nach Zugabe von 100 eq. DET			proz. Änderung	$\Delta\lambda_{max}(Em)/[nm]$
	$\lambda_{max}(Em)/[nm]$	abs. Intensität	rel. Intensität	$\lambda_{max}(Em)/[nm]$	abs. Intensität	rel. Intensität		
Tryptophan	332	491	1	328	411	0.837	-16.3%	0
Dansyl	520	69	0.141	508	116	0.236	+9.5%	0

2. Kontrollexperimente:

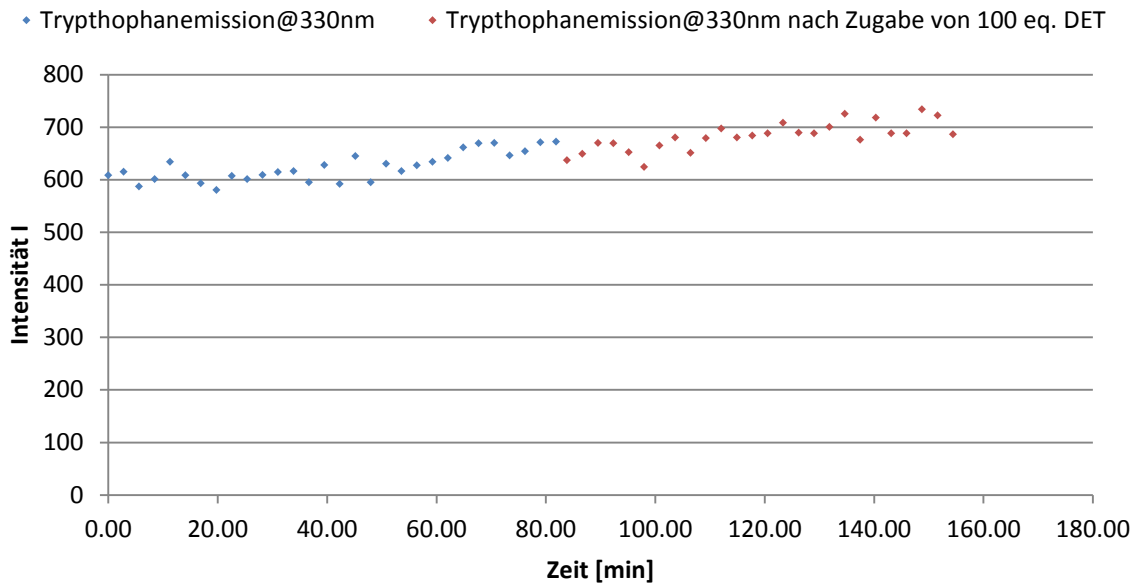


Abbildung 465: Zeitliche Änderung der Donor-Fluoreszenzintensität I vor und nach Zugabe von 100 eq. DET (2 % in DPPC).

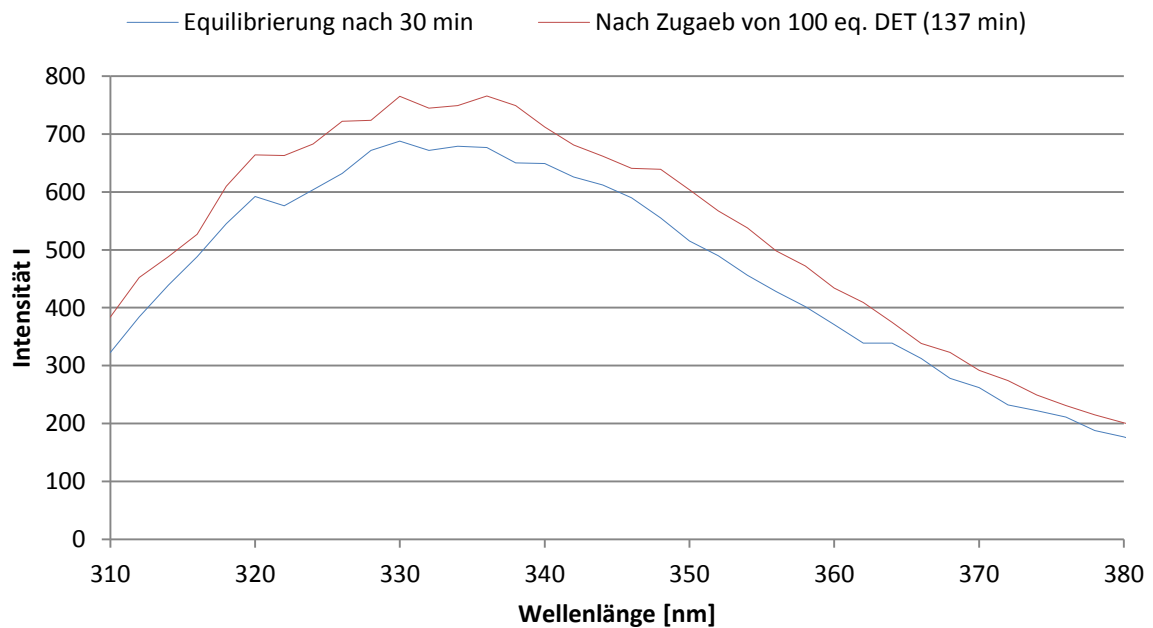


Abbildung 466: Emissionspektren des FRET-Donors 66 vor und nach Zugabe von 100 eq. DET (2 % in DPPC).

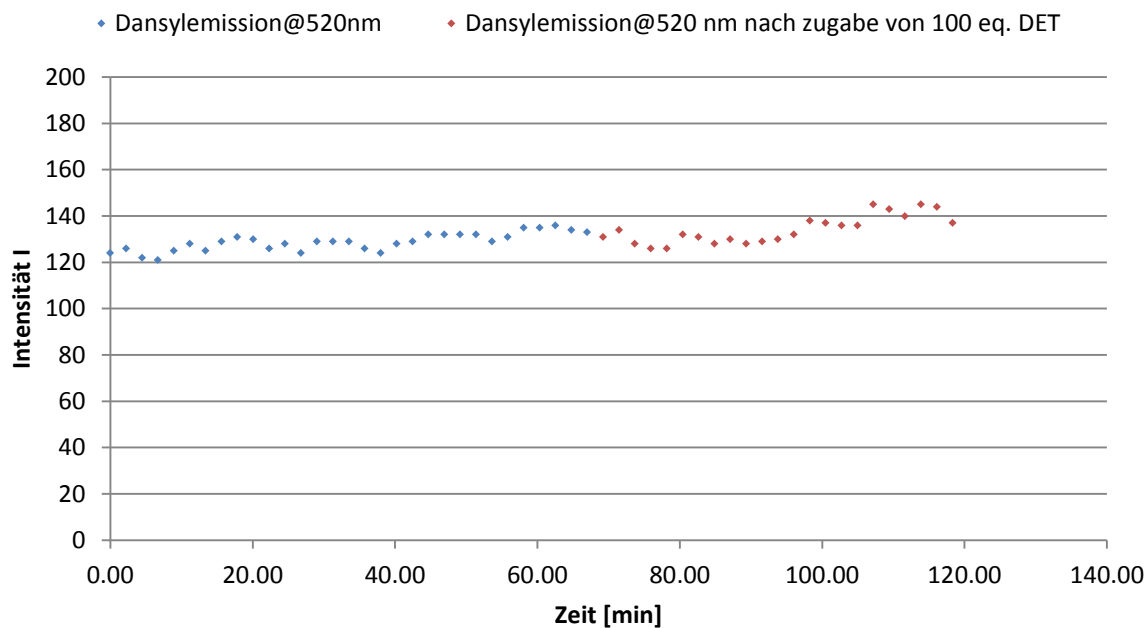


Abbildung 467: Zeitliche Änderung der Akzeptor-Fluoreszenzintensität I vor und nach Zugabe von 100 eq. DET (2 % in DPPC).

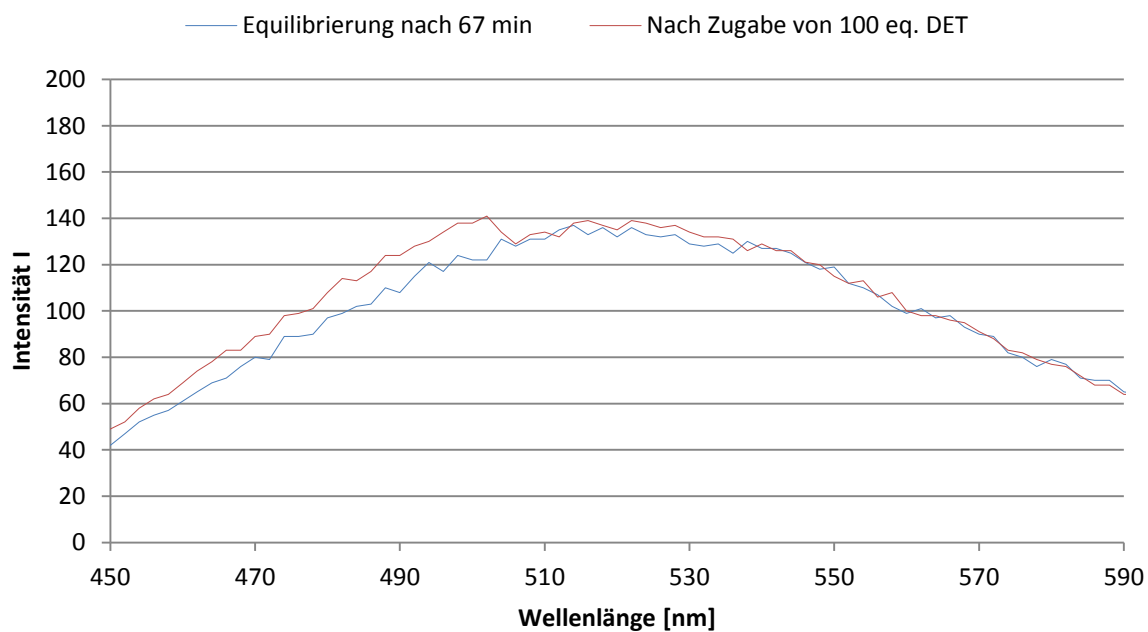


Abbildung 468: Emissionsspektren des FRET-Akzeptors 67 vor und nach Zugabe von 100 eq. DET (2 % in DPPC).

▪ **Dotierung mit je 1.5 % der Transmembranbausteine 66 und 67**

1. Signaltransduktionsexperimente:

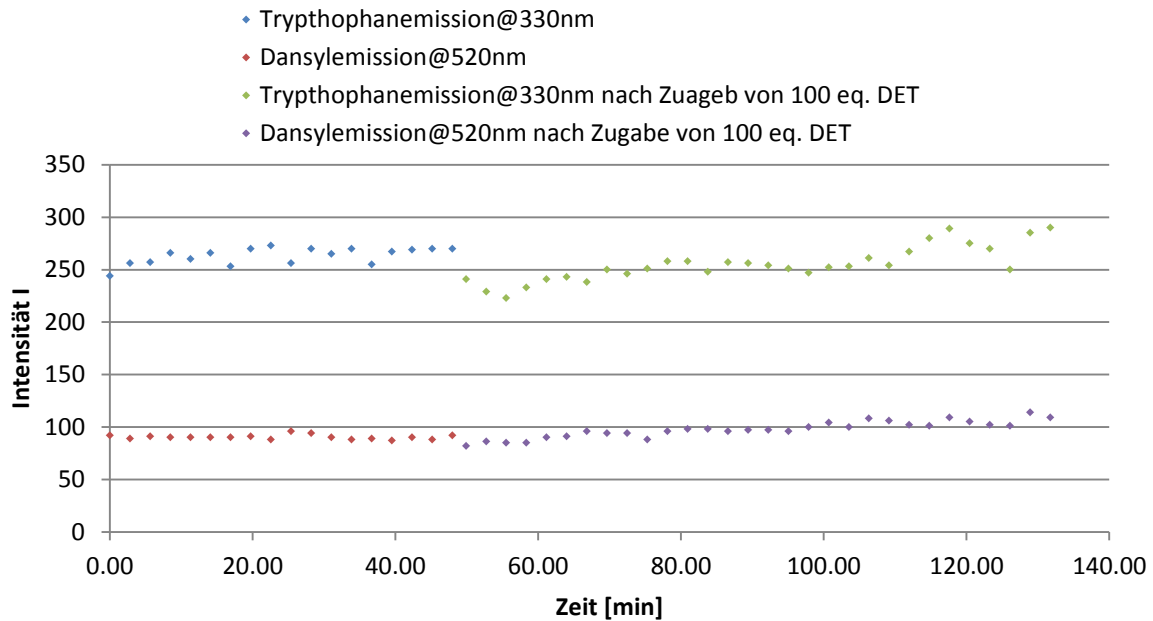


Abbildung 469: Zeitliche Änderung der Fluoreszenzintensität I vor und nach Zugabe von 100 eq. DET (3 % in DPPC).

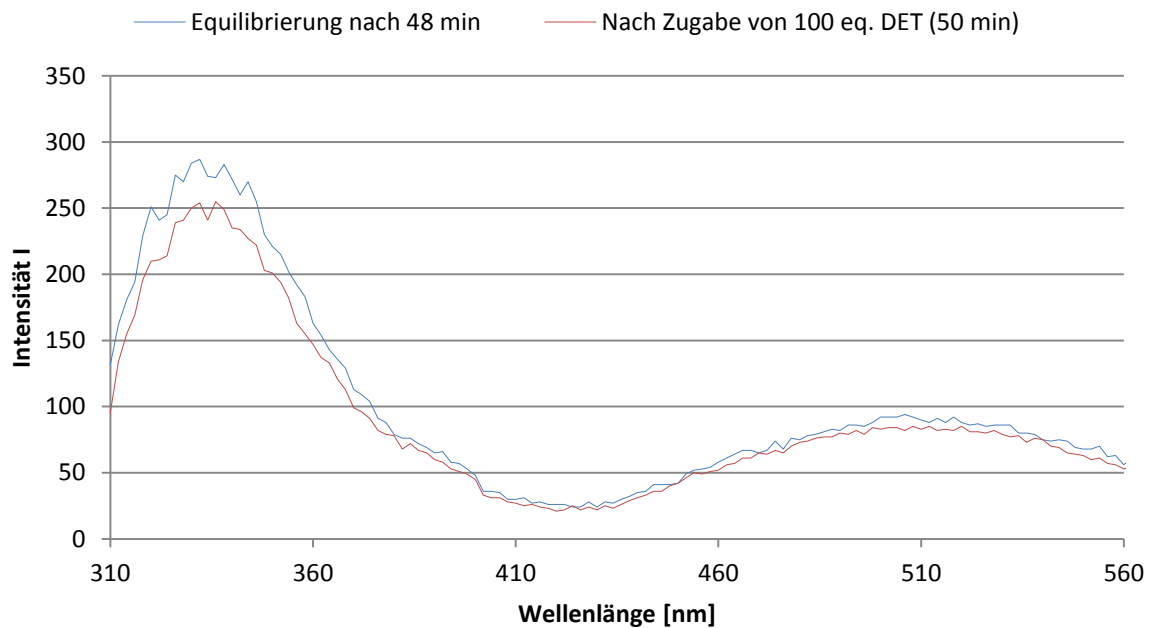


Abbildung 470: Emissionsspektren vor und nach Zugabe von 100 eq. DET (3 % in DPPC).

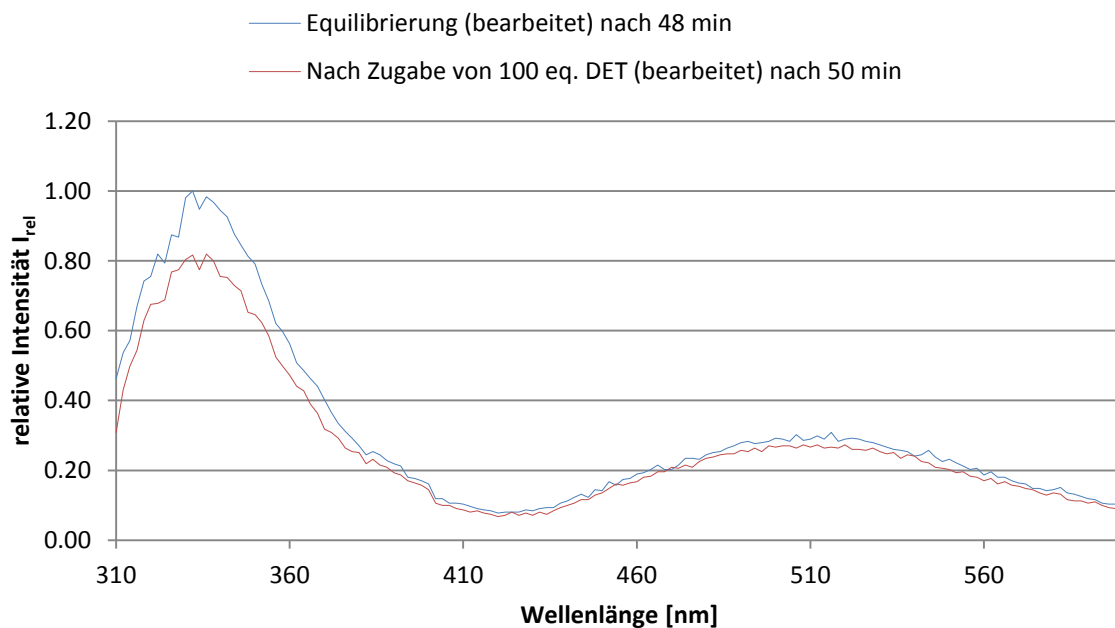


Abbildung 471: Änderung der relativen Intensitäten I_{rel} nach Zugabe von 100 eq. DET (3 % in DPPC).

Tabelle 12: Prozentuale Änderung der relativen Intensitäten I_{rel} nach Zugabe von 100 eq. DET (3 % in DPPC).

	Vor Zugabe von 100 eq. DET			Nach Zugabe von 100 eq. DET			proz. Änderung	$\Delta\lambda_{max}(Em)/[nm]$
	$\lambda_{max}(Em)/[nm]$	abs. Intensität	rel. Intensität	$\lambda_{max}(Em)/[nm]$	abs. Intensität	rel. Intensität		
Tryptophan	332	311	1	332	254	0.817	-18.3%	0
Dansyl	516	96	0.309	508	85	0.273	-3.6%	-8

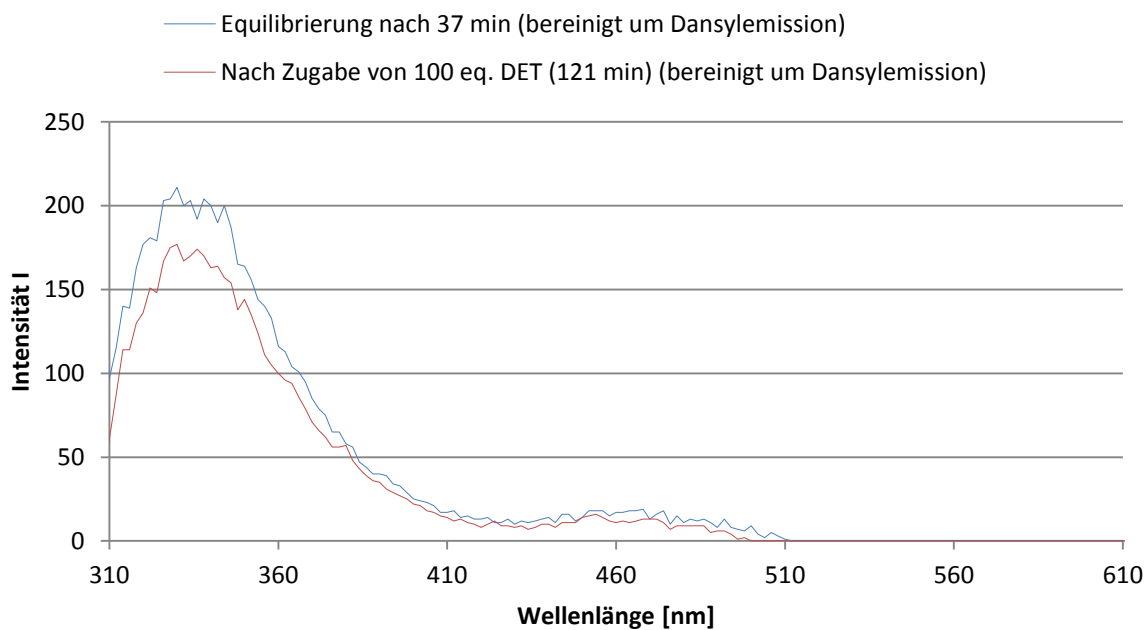


Abbildung 472: Um Dansylemission bereinigte Emissionsspektren ($\lambda_{Ex} = 280$ nm) vor und nach Zugabe von 100 eq. DET (3 % in DPPC).

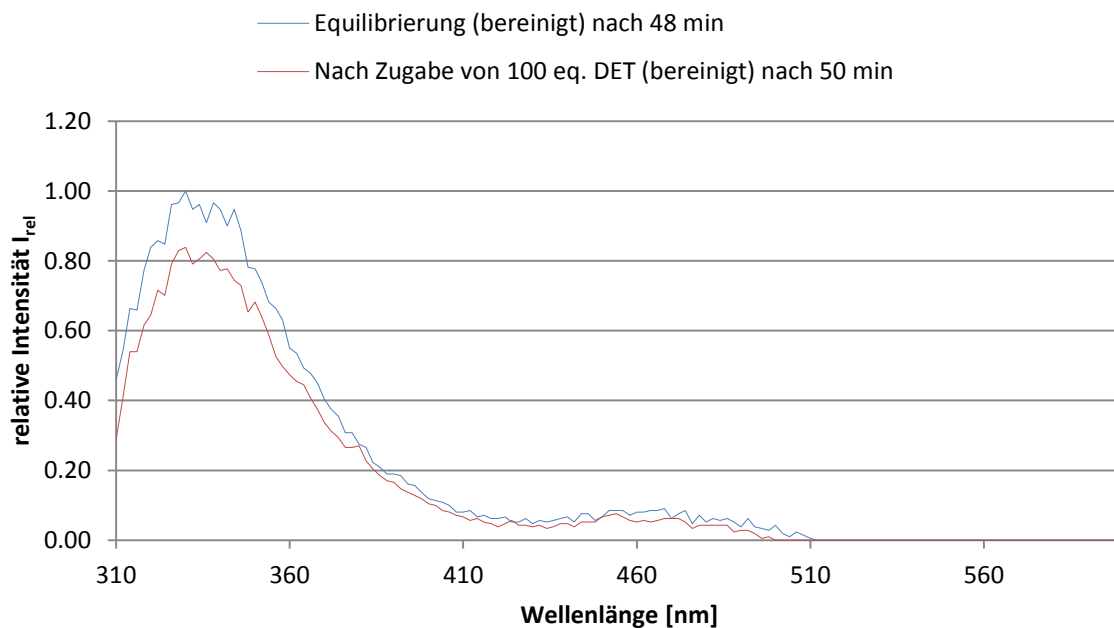


Abbildung 473: Änderung der relativen Intensitäten I_{rel} nach Zugabe von 100 eq. DET (um Dansylemission ($\lambda_{Ex} = 280$ nm) bereinigt) (3 % in DPPC).

Tabelle 13: Änderung der bereinigten relativen Intensitäten I_{rel} nach Zugabe von 100 eq. DET (3 % in DPPC).

	Vor Zugabe von 100 eq. DET			Nach Zugabe von 100 eq. DET			proz. Änderung $\Delta\lambda_{max}(Em)/[nm]$	
	$\lambda_{max}(Em)/[nm]$	abs. Intensität	rel. Intensität	$\lambda_{max}(Em)/[nm]$	abs. Intensität	rel. Intensität		
Tryptophan	332	211	1	328	167	0.817	-18.3%	0
Dansyl	520	0	0	508	0	0	0	0

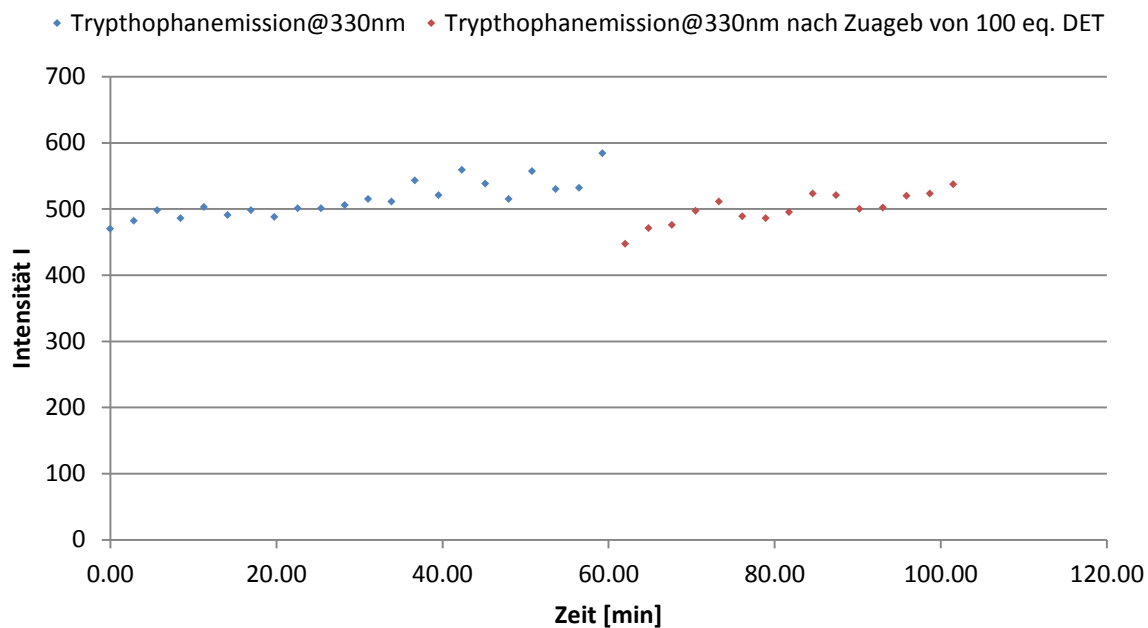
2. Kontrollexperimente:

Abbildung 474: Zeitliche Änderung der Donor-Fluoreszenzintensität I vor und nach Zugabe von 100 eq. DET (1.5 % in DPPC).

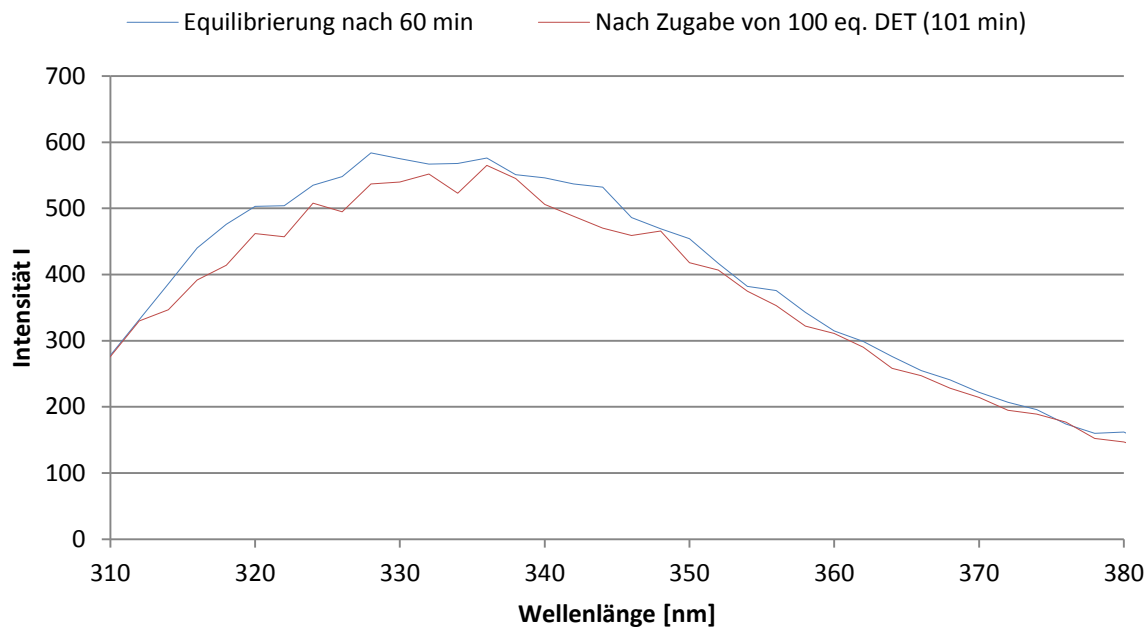


Abbildung 475: Emissionspektren des FRET-Donors 66 vor und nach Zugabe von 100 eq. DET (1.5 % in DPPC).

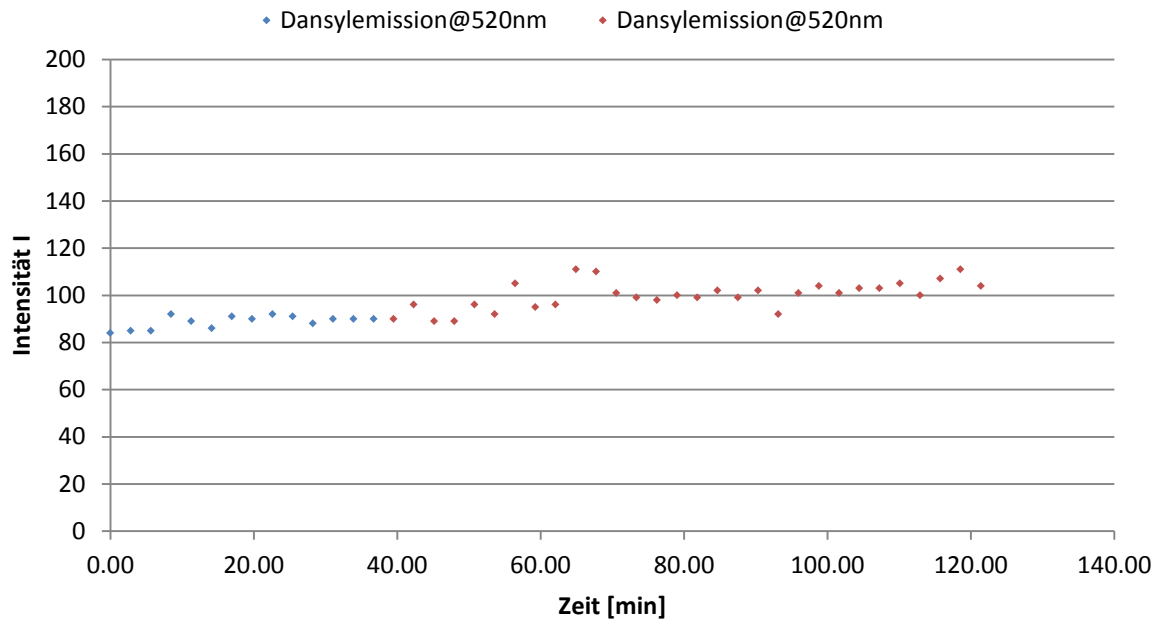


Abbildung 476: Zeitliche Änderung der Akzeptor-Fluoreszenzintensität I vor und nach Zugabe von 100 eq. DET (1.5 % in DPPC).

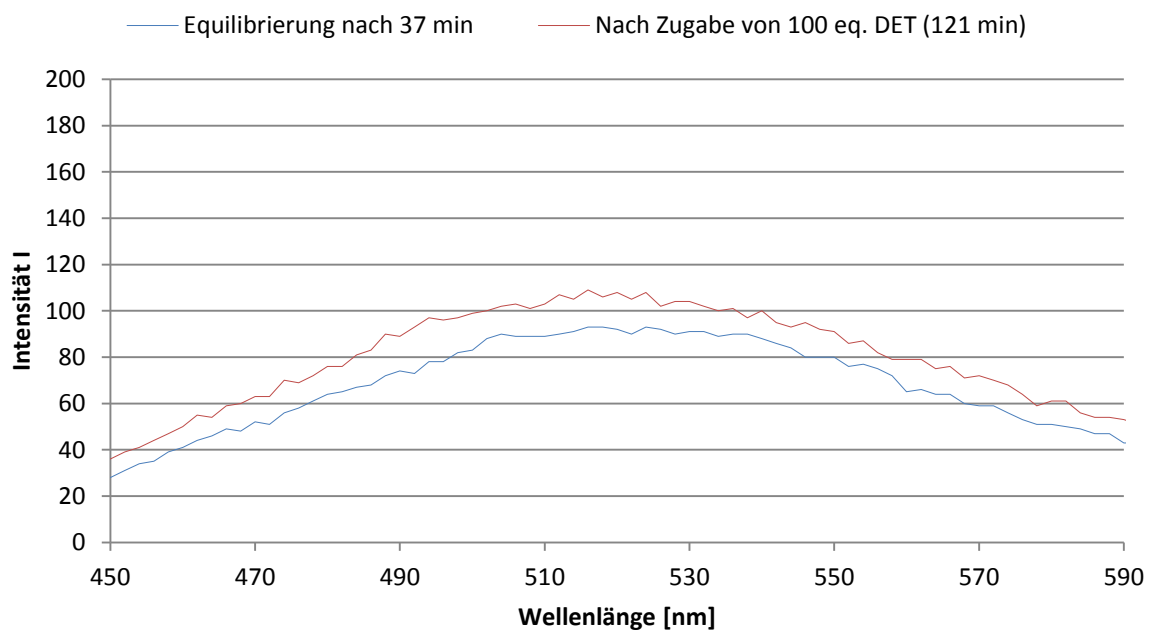


Abbildung 477: Emissionsspektren des FRET-Akzeptors 67 vor und nach Zugabe von 100 eq. DET (1.5 % in DPPC).

5.4.2 Signaltransduktionsexperimente mit DMPC-Liposomen

- Dotierung mit je 2.5 % der Transmembranbausteine 66 und 67

1. Signaltransduktionsexperimente:

- ♦ Tryptophanemission@330nm
- ♦ Dansylemission@520nm
- ♦ Tryptophanemission@330nm nach 100 eq.DET
- ♦ Dansylemission@520 nm nach 100 eq.DET

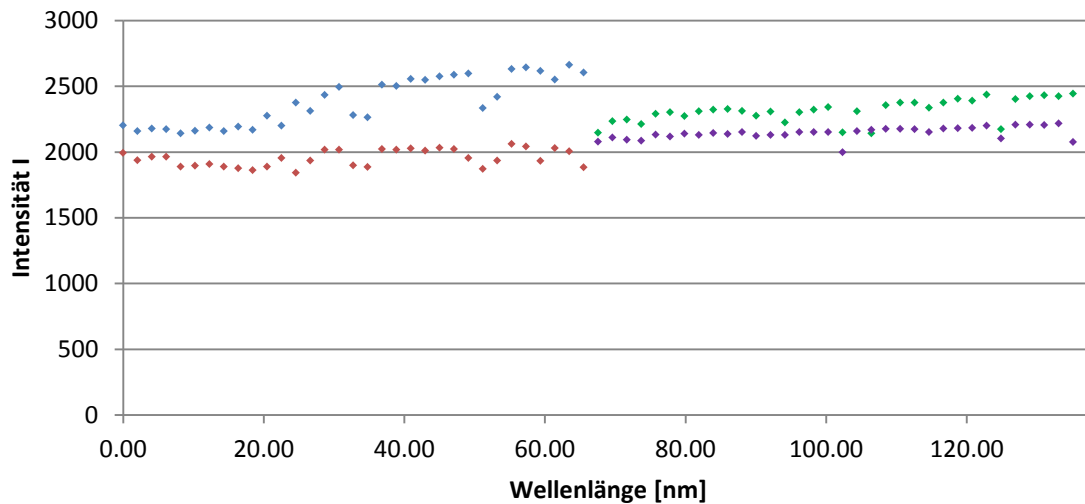


Abbildung 478: Zeitliche Änderung der Fluoreszenzintensität I vor und nach Zugabe von 100 eq. DET (5 % in DMPC).

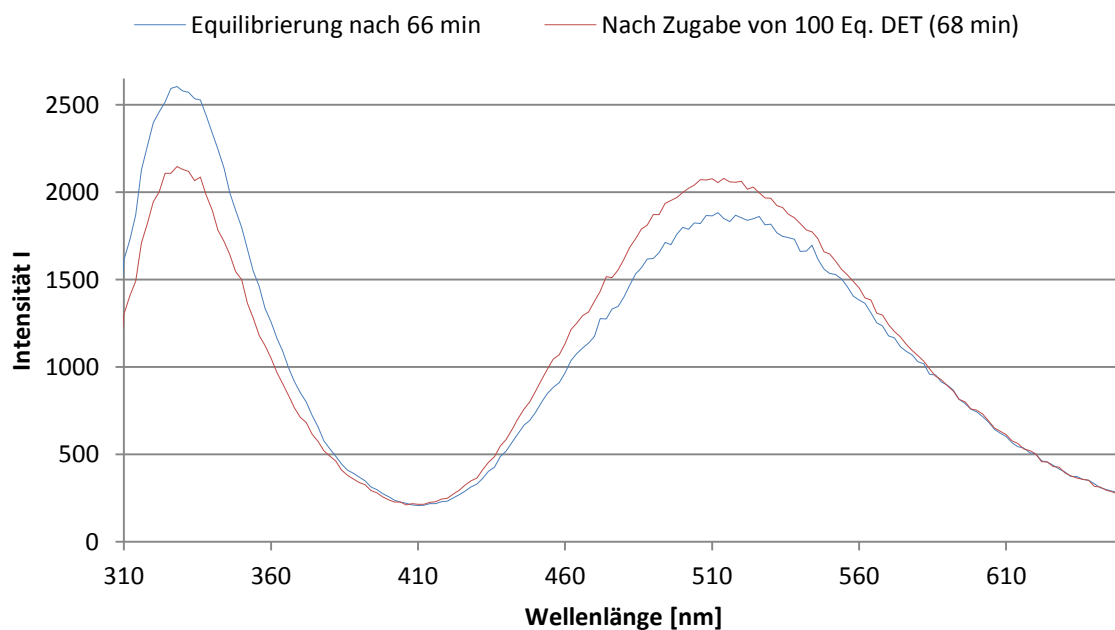


Abbildung 479: Emissionsspektren vor und nach Zugabe von 100 eq. DET (5 % in DMPC).

5.4.3 Signaltransduktionsexperimente mit DMPC/DPPC-Liposomen

▪ Liposomen mit 90 % DMPC- und 10 % DPPC-Anteil

Dotierung mit je 2.5 % der Transmembranbausteine 66 und 67

1. Signaltransduktionsexperimente:

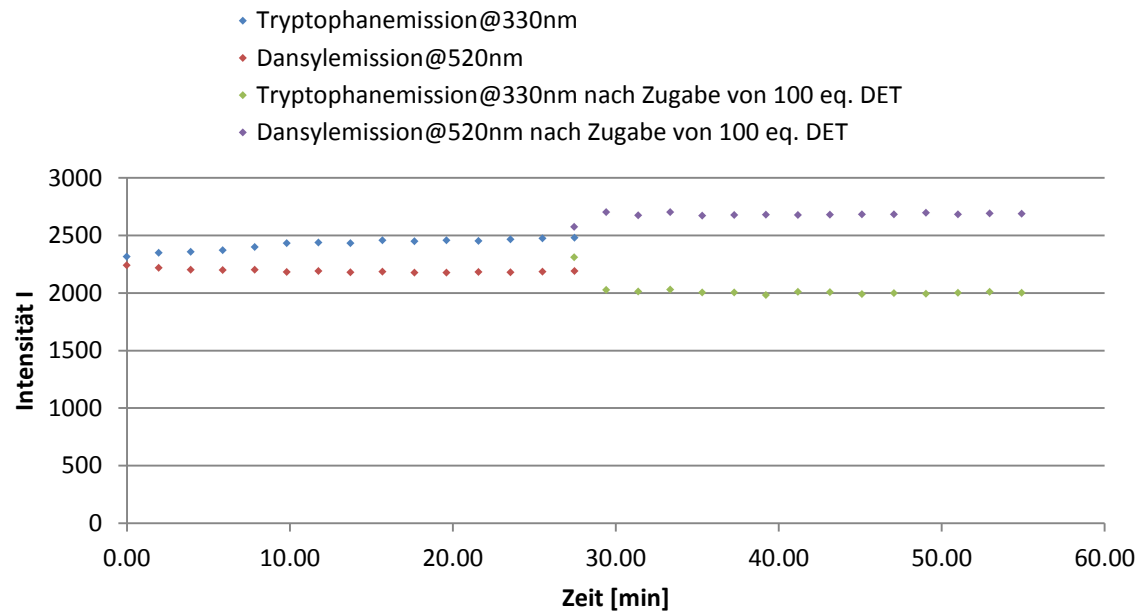


Abbildung 480: Zeitliche Änderung der Fluoreszenzintensität I vor und nach Zugabe von 100 eq. DET (5 % in 90 % DMPC - 10 % DPPC).

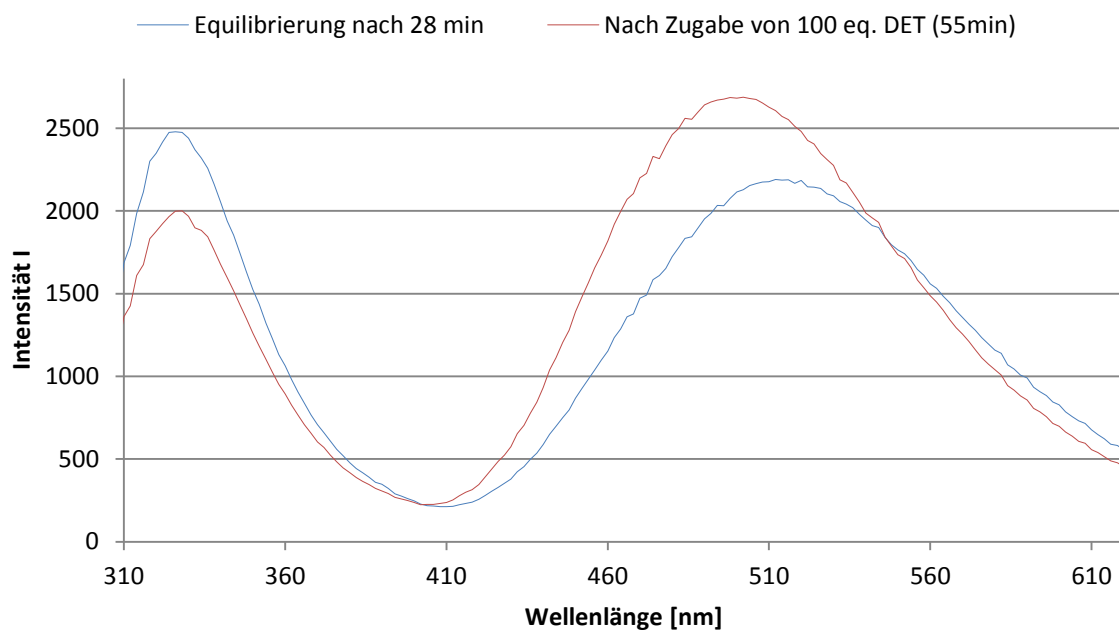


Abbildung 481: Emissionsspektren vor und nach Zugabe von 100 eq. DET (5 % in 90 % DMPC - 10 % DPPC).

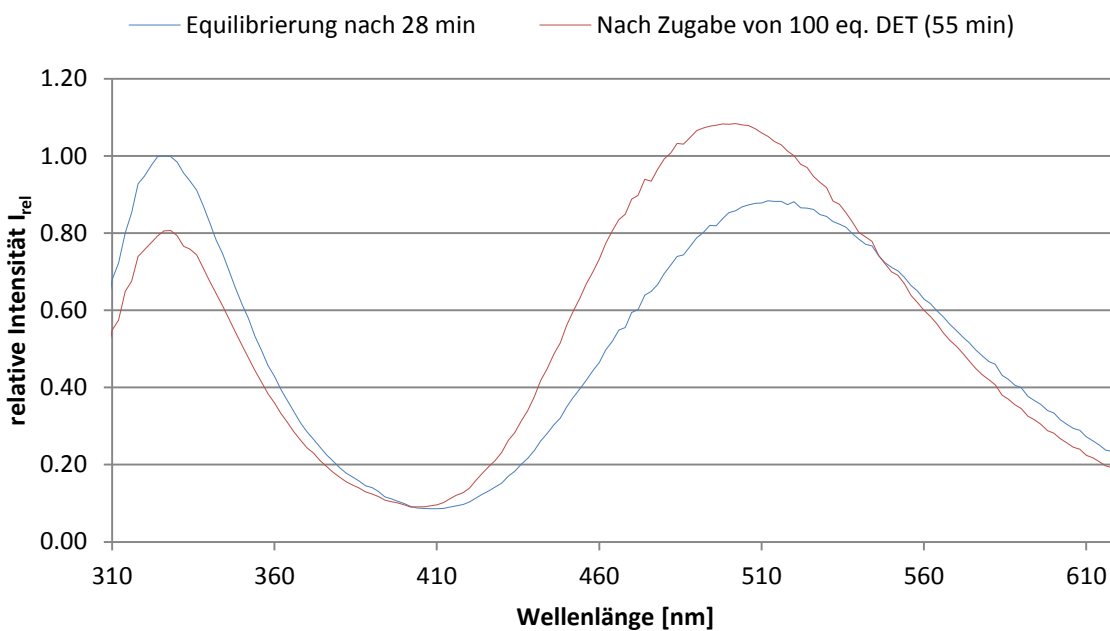


Abbildung 482: Änderung der relativen Intensitäten I_{rel} nach Zugabe von 100 eq. DET (5 % in 90 % DMPC - 10 % DPPC).

Tabelle 14: Prozentuale Änderung der relativen Intensitäten I_{rel} nach Zugabe von 100 eq. DET (5 % in 90 % DMPC - 10 % DPPC).

	Vor Zugabe von 100 eq. DET			Nach Zugabe von 100 eq. DET			proz. Änderung	$\Delta\lambda_{max} (Em)/[nm]$
	$\lambda_{max} (Em)/[nm]$	abs. Intensität	rel. Intensität	$\lambda_{max} (Em)/[nm]$	abs. Intensität	rel. Intensität		
Tryptophan	326	2479	1	326	1998	0.81	-19%	0
Dansyl	520	2185	0.88	502	2688	1.08	+20%	-12

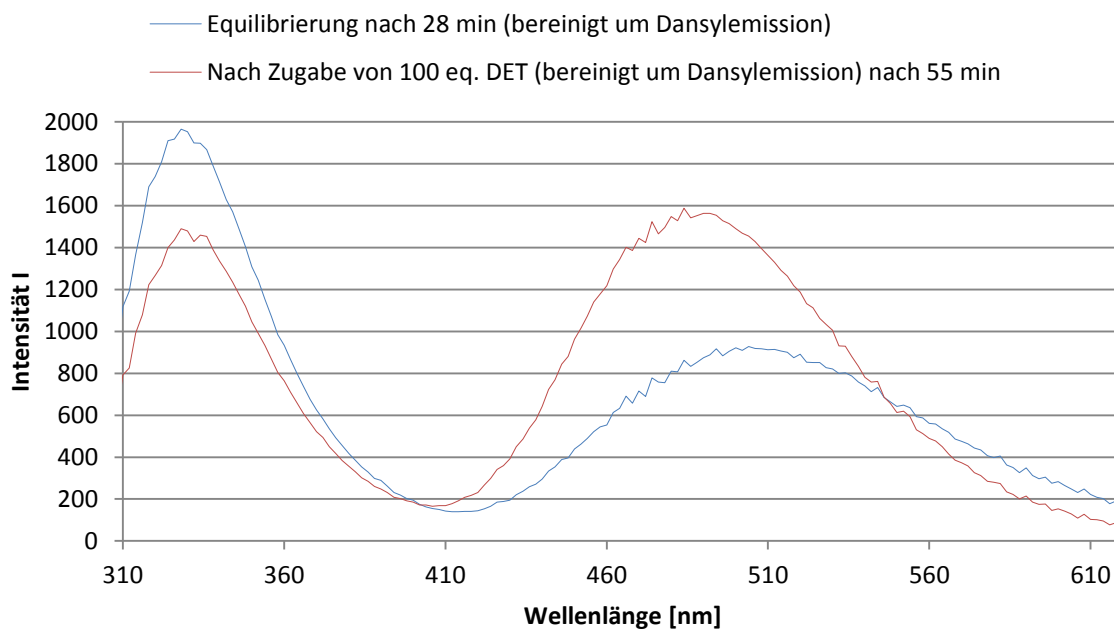


Abbildung 483: Um Dansylemission bereinigte Emissionsspektren ($\lambda_{Ex} = 280 \text{ nm}$) vor und nach Zugabe von 100 eq. DET (5 % in 90 % DMPC - 10 % DPPC).

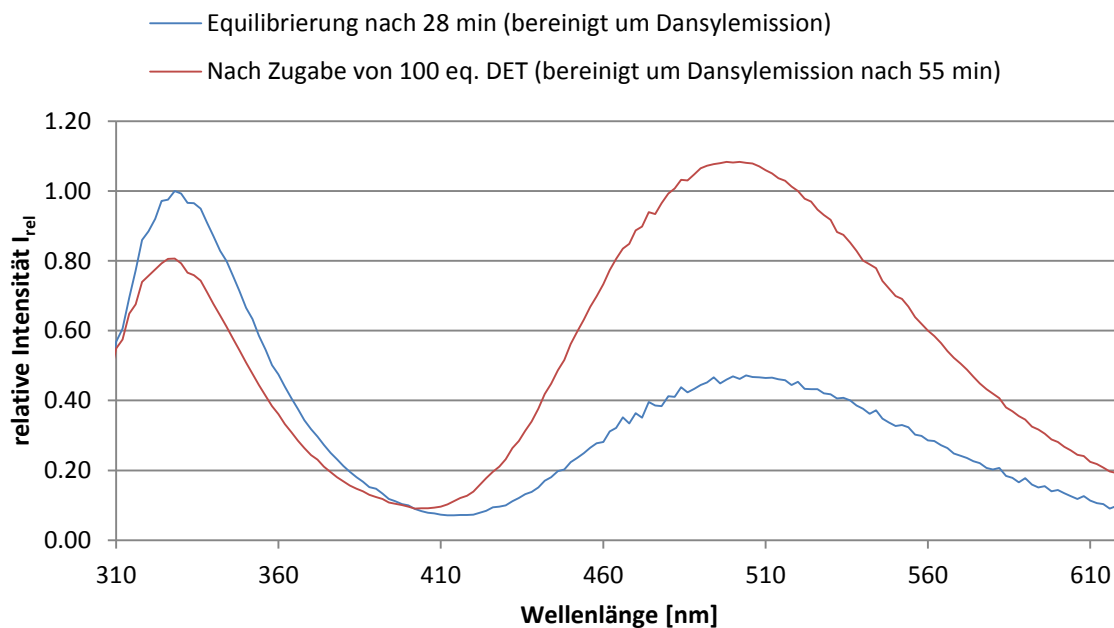


Abbildung 484: Änderung der relativen Intensitäten I_{rel} nach Zugabe von 100 eq. DET (um Dansylemission ($\lambda_{\text{Ex}} = 280 \text{ nm}$) bereinigt) (5 % in 90 % DMPC – 10 % DPPC).

Tabelle 15: Änderung der bereinigten relativen Intensitäten I_{rel} nach Zugabe von 100 eq. DET (5 % in 90 % DMPC – 10 % DPPC).

	Vor Zugabe von 100 eq. DET			Nach Zugabe von 100 eq. DET			proz. Änderung $\Delta\lambda_{\text{max}} (\text{Em})/[\text{nm}]$	
	$\lambda_{\text{max}} (\text{Em})/[\text{nm}]$	abs. Intensität	rel. Intensität	$\lambda_{\text{max}} (\text{Em})/[\text{nm}]$	abs. Intensität	rel. Intensität		
Tryptophan	326	1918	1	326	1437	0.81	-19%	0
Dansyl	504	928	0.47	484	1588	1.03	+56%	-20

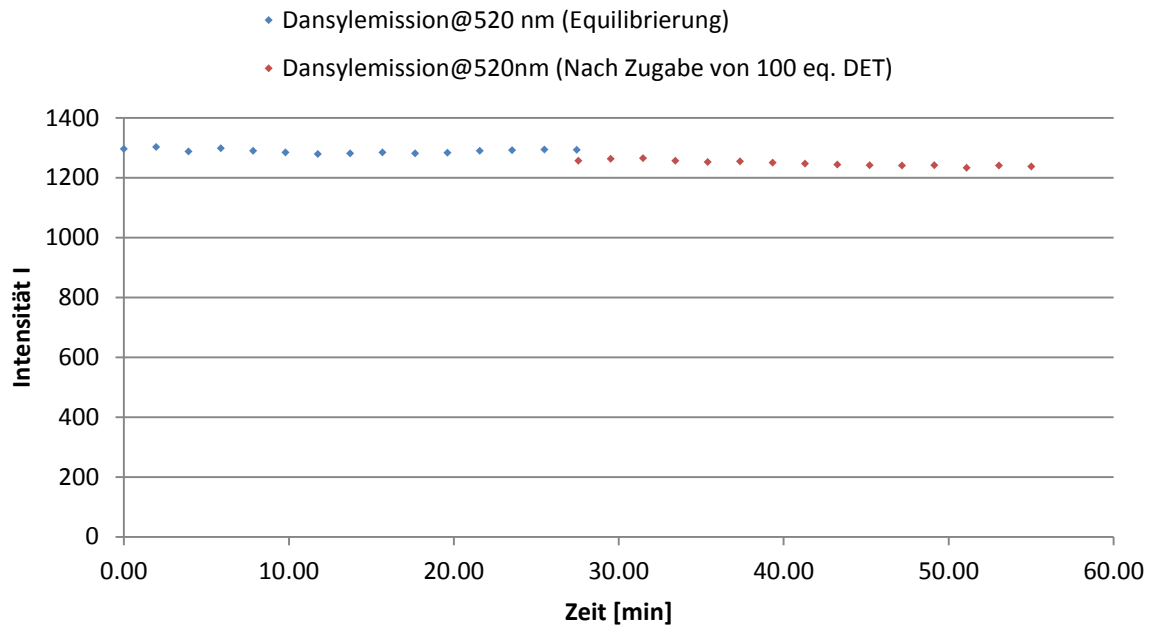
2. Kontrollexperimente:

Abbildung 485: Zeitliche Änderung der Akzeptor-Fluoreszenzintensität I vor und nach Zugabe von 100 eq. DET (2.5 % in 90 % DMPC – 10 % DPPC).

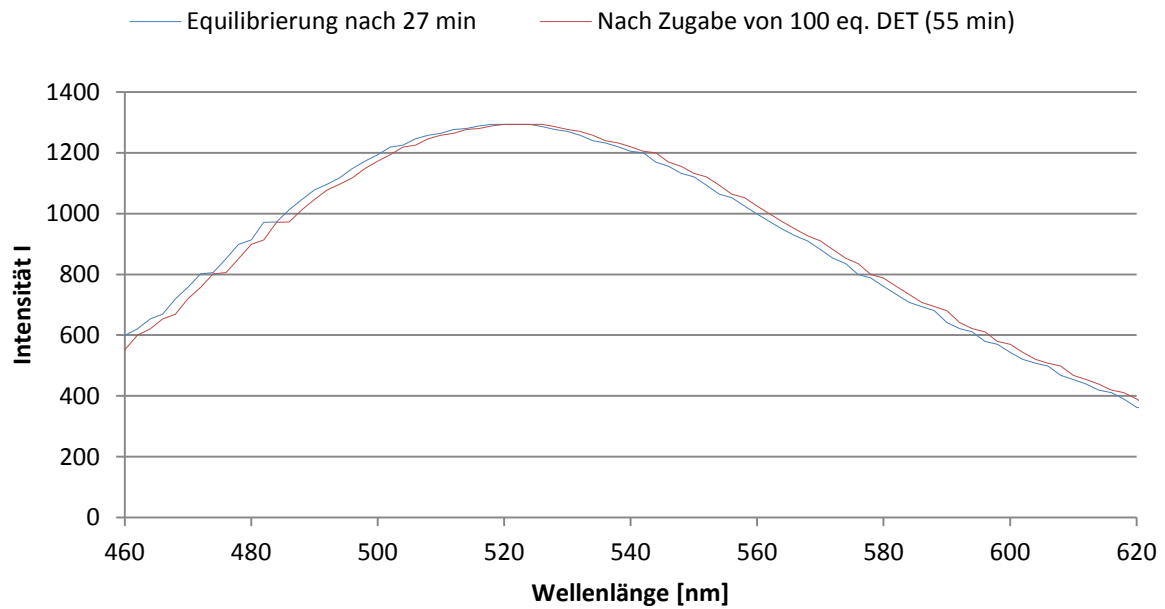


Abbildung 486: Emissionsspektren des FRET-Akzeptors 67 vor und nach Zugabe von 100 eq. DET (2.5 % in 90 % DMPC – 10 % DPPC).

- **Liposomen mit 75 % DMPC- und 25 % DPPC-Anteil**
 - **Dotierung mit je 2.5 % der Transmembranbausteine 66 und 67**

1. Signaltransduktionsexperimente:

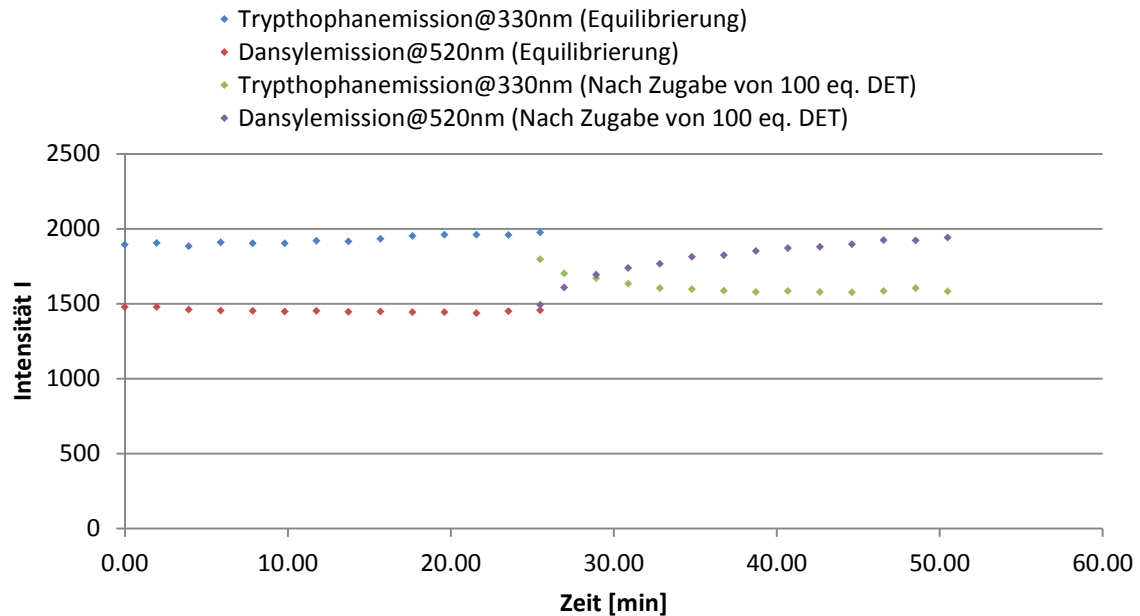


Abbildung 487: Zeitliche Änderung der Fluoreszenzintensität I vor und nach Zugabe von 100 eq. DET (5 % in 75 % DMPC - 25 % DPPC).

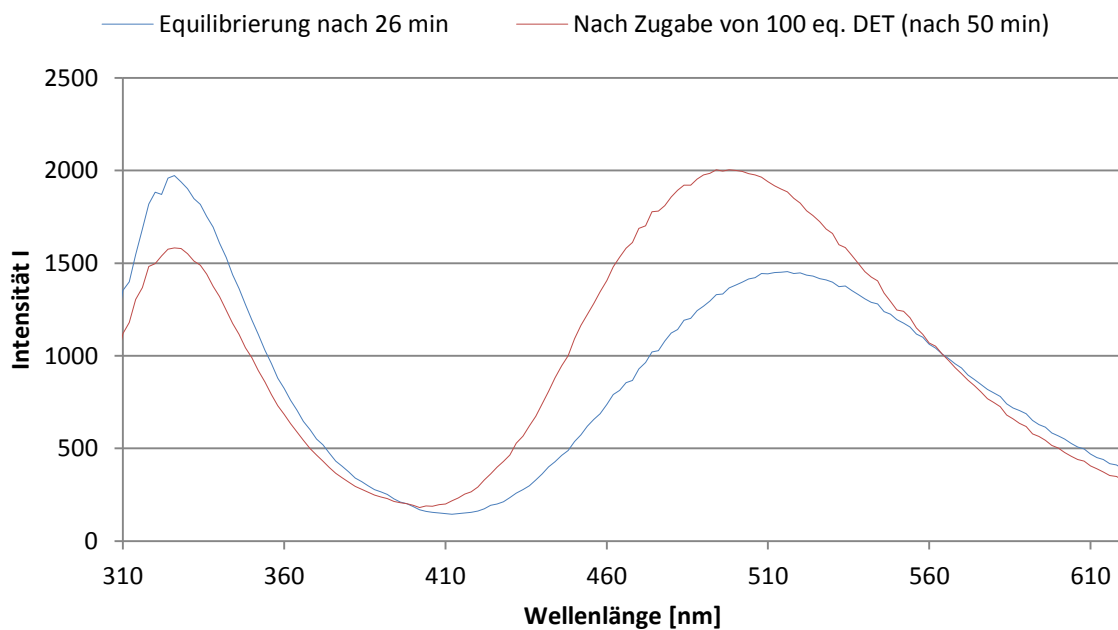


Abbildung 488: Emissionsspektren vor und nach Zugabe von 100 eq. DET (5 % in 75 % DMPC - 25 % DPPC).

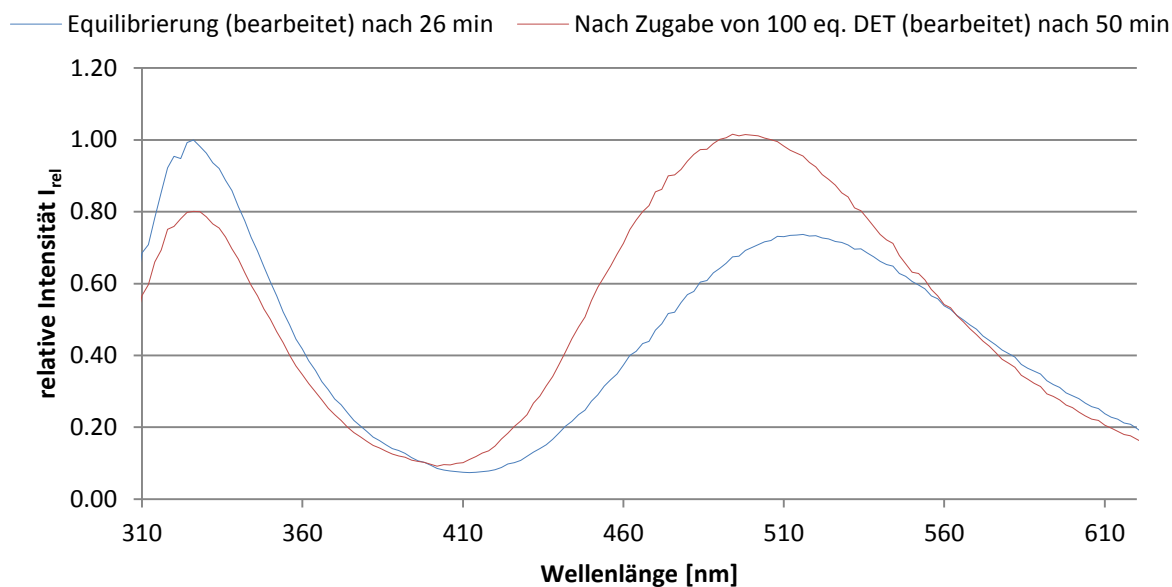


Abbildung 489: Änderung der relativen Intensitäten I_{rel} nach Zugabe von 100 eq. DET (5 % in 75 % DMPC – 25 % DPPC).

Abbildung 490: Prozentuale Änderung der relativen Intensitäten I_{rel} nach Zugabe von 100 eq. DET (5 % in 75 % DMPC – 25 % DPPC).

	Vor Zugabe von 100 eq. DET			Nach Zugabe von 100 eq. DET				
	$\lambda_{\text{max}}(\text{Em})/[\text{nm}]$	abs. Intensität	rel. Intensität	$\lambda_{\text{max}}(\text{Em})/[\text{nm}]$	abs. Intensität	rel. Intensität	proz. Änderung	$\Delta\lambda_{\text{max}}(\text{Em})/[\text{nm}]$
Tryptophan	326	1974	1	326	1582	0.80	-20%	0
Dansyl	516	1455	0.74	498	2004	1.02	+28%	-18

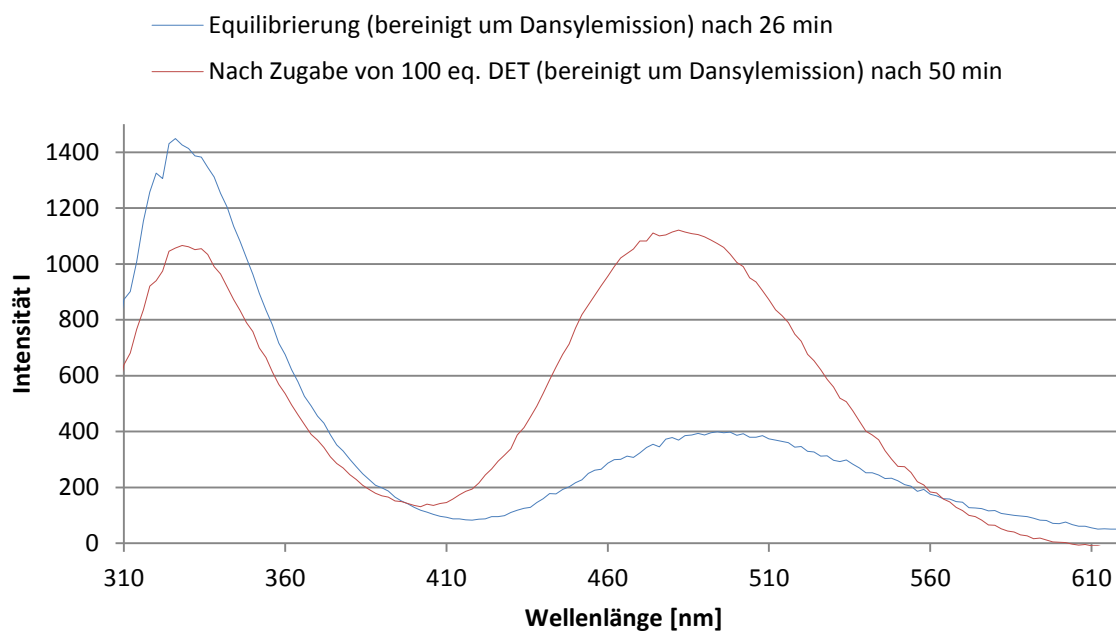


Abbildung 491: Um Dansylemission bereinigte Emissionsspektren ($\lambda_{\text{Ex}} = 280 \text{ nm}$) vor und nach Zugabe von 100 eq. DET (5 % in 75 % DMPC – 25 % DPPC).

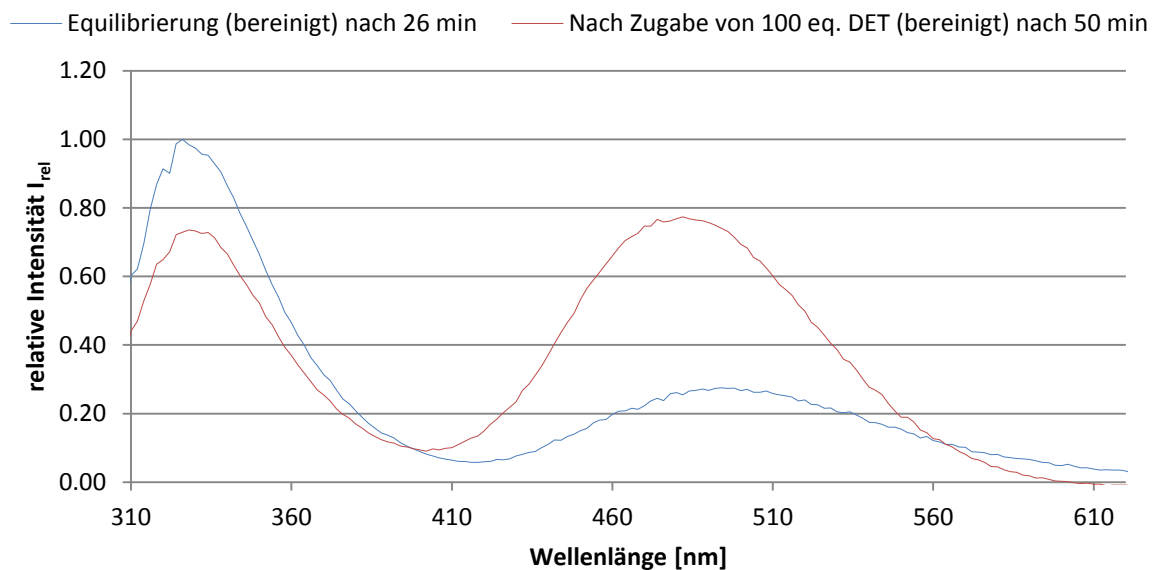


Abbildung 492: Änderung der relativen Intensitäten I_{rel} nach Zugabe von 100 eq. DET (um Dansylemission ($\lambda_{\text{Ex}} = 280 \text{ nm}$) bereinigt) (5 % in 75 % DMPC – 25 % DPPC).

Tabelle 16: Änderung der bereinigten relativen Intensitäten I_{rel} nach Zugabe von 100 eq. DET (5 % in 75 % DMPC – 25 % DPPC).

	Vor Zugabe von 100 eq. DET			Nach Zugabe von 100 eq. DET			proz. Änderung $\Delta\lambda_{\text{max}} (\text{Em})/[\text{nm}]$	
	$\lambda_{\text{max}} (\text{Em})/[\text{nm}]$	abs. Intensität	rel. Intensität	$\lambda_{\text{max}} (\text{Em})/[\text{nm}]$	abs. Intensität	rel. Intensität		
Tryptophan	326	1449	1	326	1057	0.73	-27%	0
Dansyl	516	360	0.25	482	1121	0.77	+52%	-34

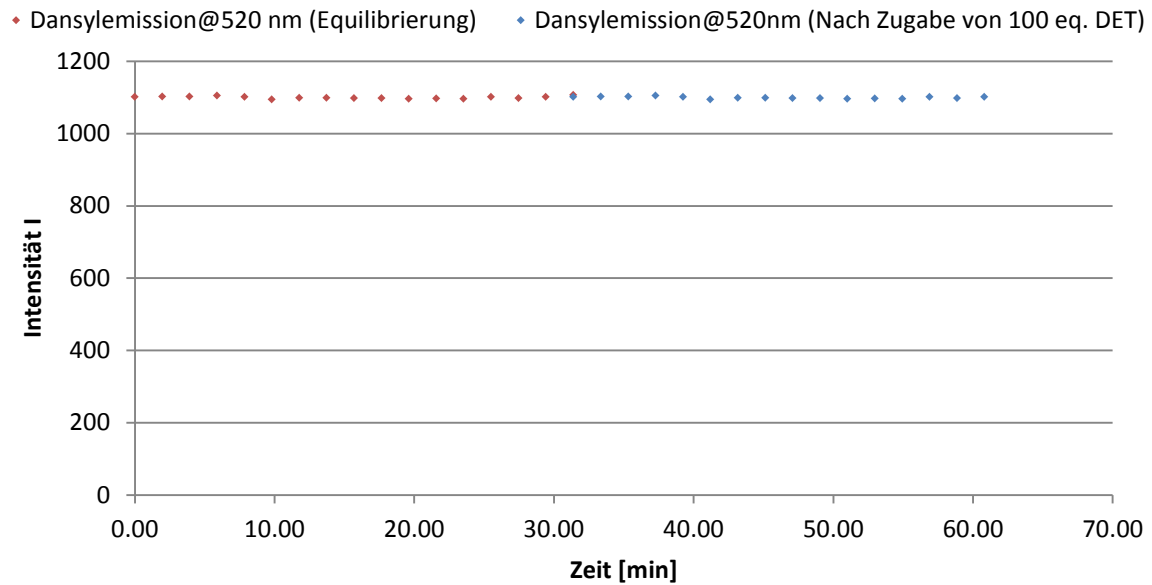
2. Kontrollexperimente:

Abbildung 493: Zeitliche Änderung der Akzeptor-Fluoreszenzintensität I vor und nach Zugabe von 100 eq. DET (2.5 % in 75 % DMPC - 25 % DPPC).

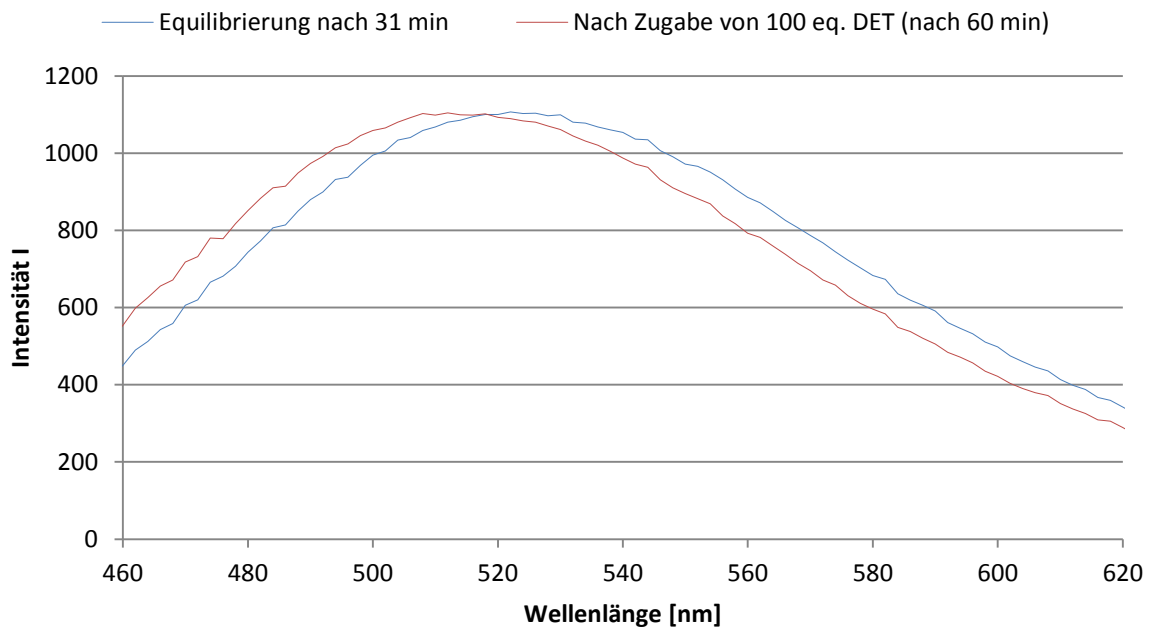


Abbildung 494: Emissionsspektren des FRET-Akzeptors 67 vor und nach Zugabe von 100 eq. DET (2.5 % in 75 % DMPC - 25 % DPPC).

- **Liposomen mit 50 % DMPC- und 50 % DPPC-Anteil**
 - **Dotierung mit je 2.5 % der Transmembranbausteine 66 und 67**

1. Signaltransduktionsexperimente

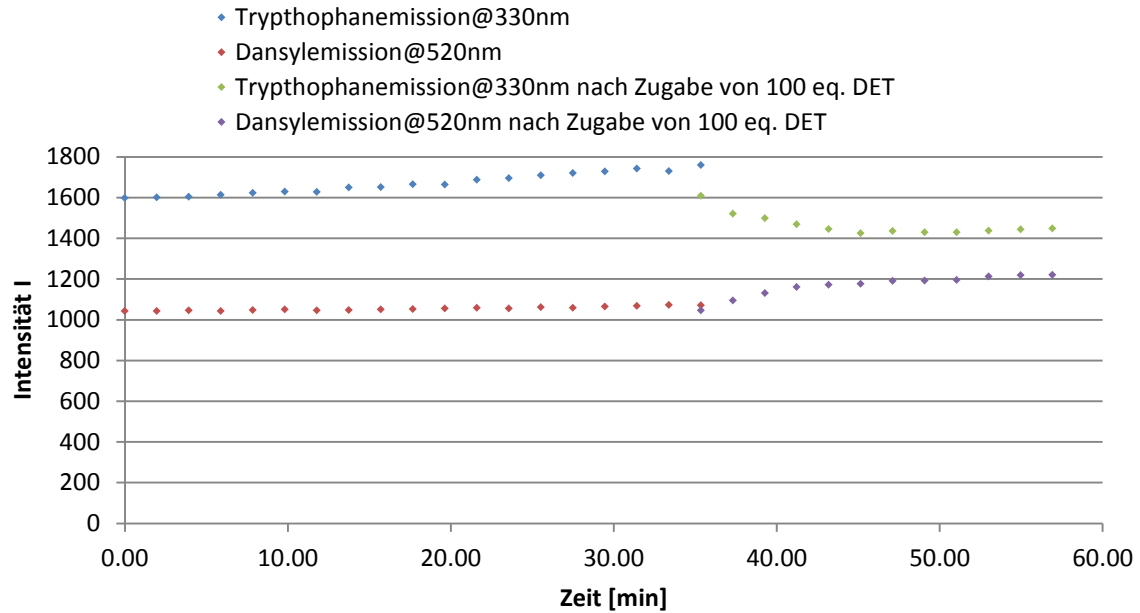


Abbildung 495: Zeitliche Änderung der Fluoreszenzintensität I vor und nach Zugabe von 100 eq. DET (5 % in 50 % DMPC – 50 % DPPC).

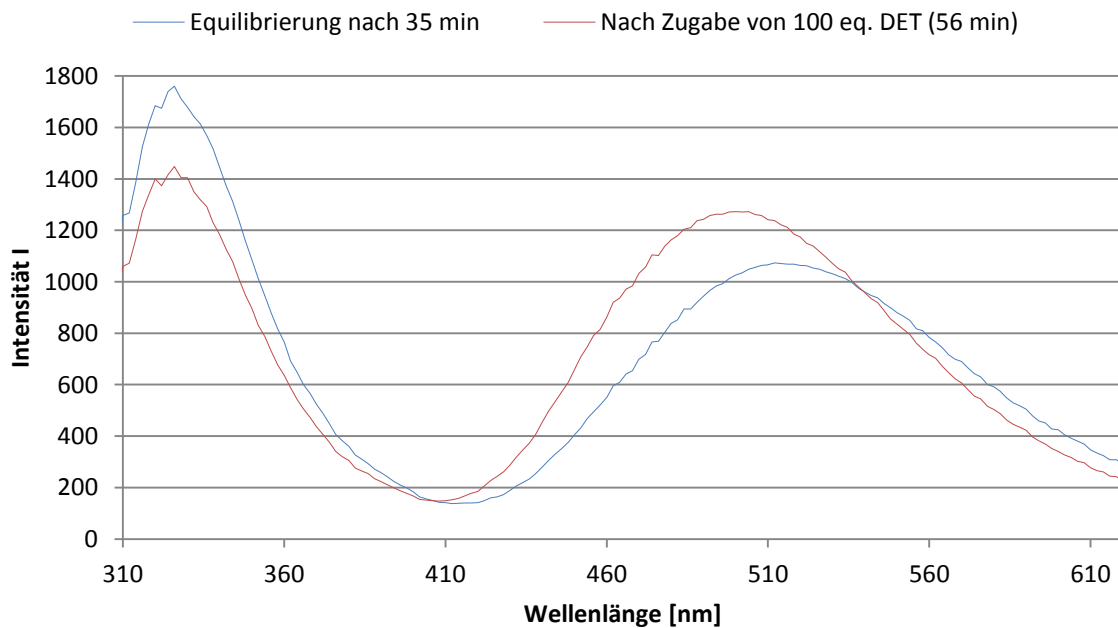


Abbildung 496: Emissionsspektren vor und nach Zugabe von 100 eq. DET (5 % in 50 % DMPC – 50 % DPPC).

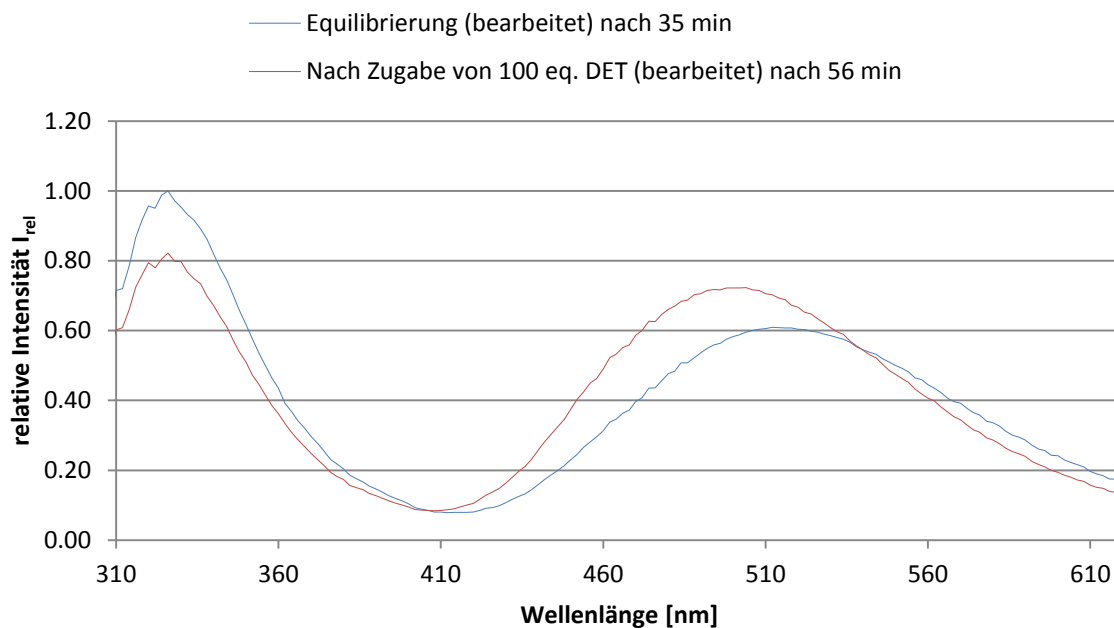


Abbildung 497: Änderung der relativen Intensitäten I_{rel} nach Zugabe von 100 eq. DET (5 % in 50 % DMPC – 50 % DPPC).

Tabelle 17: Prozentuale Änderung der relativen Intensitäten I_{rel} nach Zugabe von 100 eq. DET (5 % in 50 % DMPC – 50 % DPPC).

	Vor Zugabe von 100 eq. DET			Nach Zugabe von 100 eq. DET			proz. Änderung		$\Delta\lambda_{\text{max}}$ (Em)/[nm]
	λ_{max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität	λ_{max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität			
Tryptophan	326	1760	1	326	1448	0.82	-18%	0	
Dansyl	512	1073	0.61	494	1263	0.72	+11%	-18	

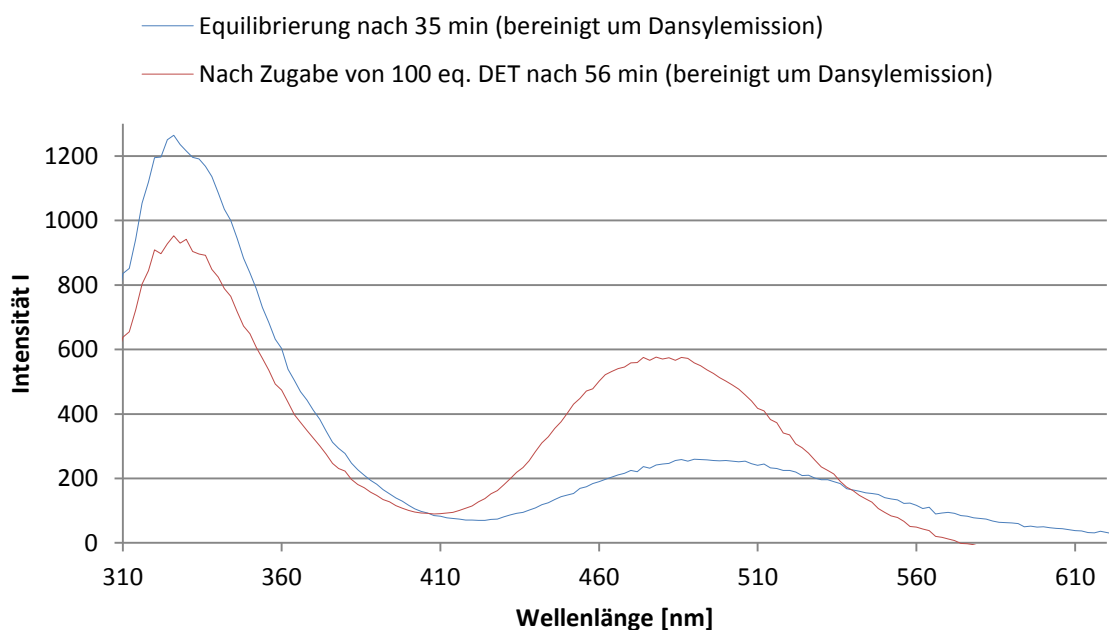


Abbildung 498: Um Dansylemission bereinigte Emissionsspektren ($\lambda_{\text{Ex}} = 280 \text{ nm}$) vor und nach Zugabe von 100 eq. DET (5 % in 50 % DMPC – 50 % DPPC).

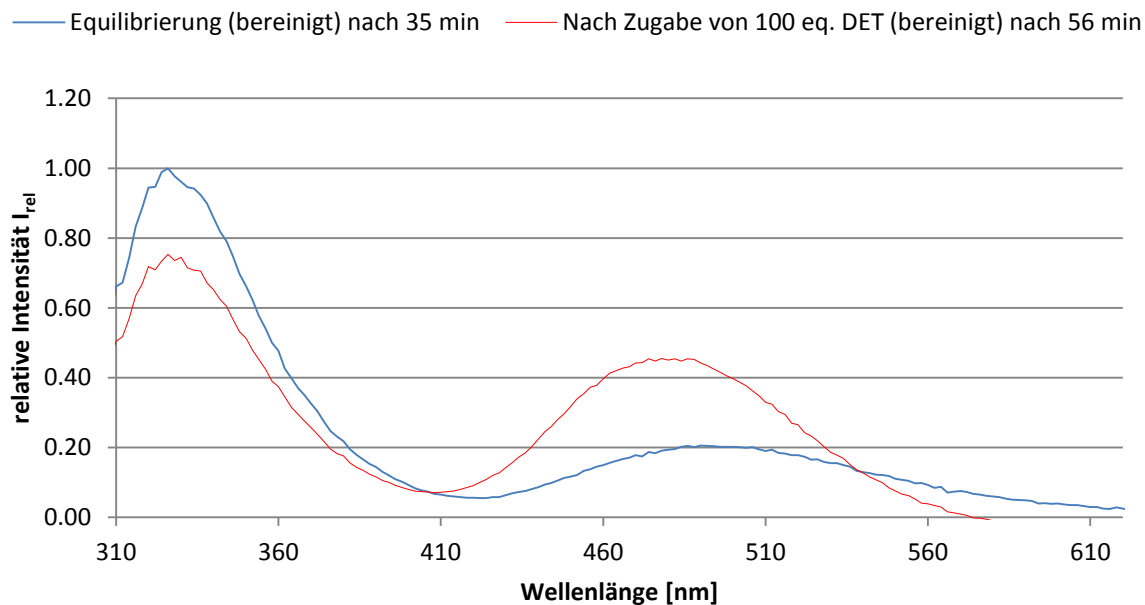


Abbildung 499: Änderung der relativen Intensitäten I_{rel} nach Zugabe von 100 eq. DET (um Dansylemission ($\lambda_{ex} = 280$ nm) bereinigt) (5 % in 50 % DMPC – 50 % DPPC).

Tabelle 18: Änderung der bereinigten relativen Intensitäten I_{rel} nach Zugabe von 100 eq. DET (5 % in 50 % DMPC – 50 % DPPC).

	Vor Zugabe von 100 eq. DET			Nach Zugabe von 100 eq. DET				
	$\lambda_{max}(Em)/[nm]$	abs. Intensität	rel. Intensität	$\lambda_{max}(Em)/[nm]$	abs. Intensität	rel. Intensität	proz. Änderung	$\Delta\lambda_{max}(Em)/[nm]$
Tryptophan	326	1265	1	326	953	0.75	-25%	0
Dansyl	512	245	0.19	486	575	0.45	+26%	-26

2. Kontrollexperimente:

♦ Dansylemission@520nm (Equilibrierung) ♦ Dansylemission@520nm (Nach Zugabe von 100 eq. DET)

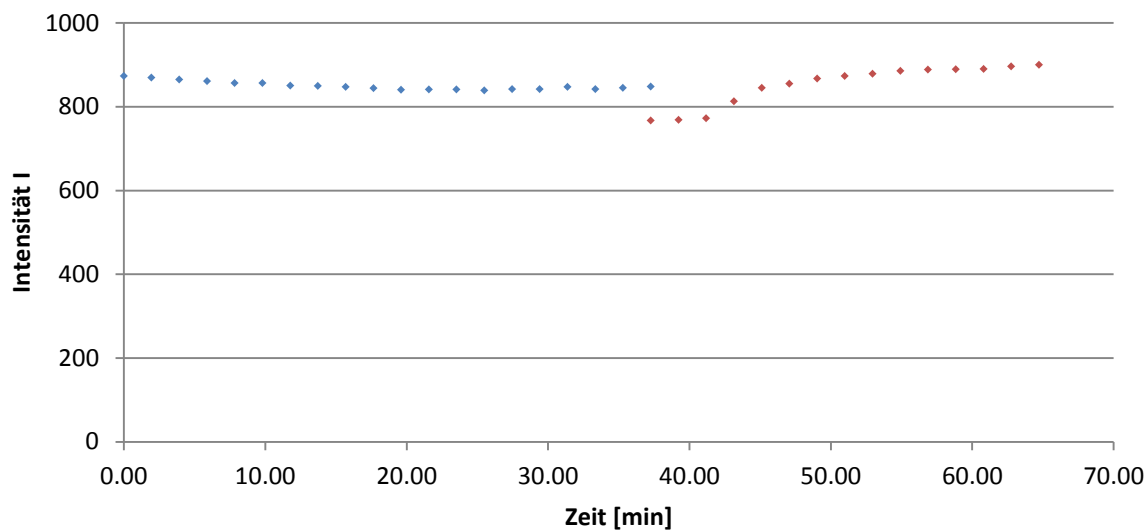


Abbildung 500: Zeitliche Änderung der Akzeptor-Fluoreszenzintensität I vor und nach Zugabe von 100 eq. DET (2.5 % in 50 % DMPC - 50 % DPPC).

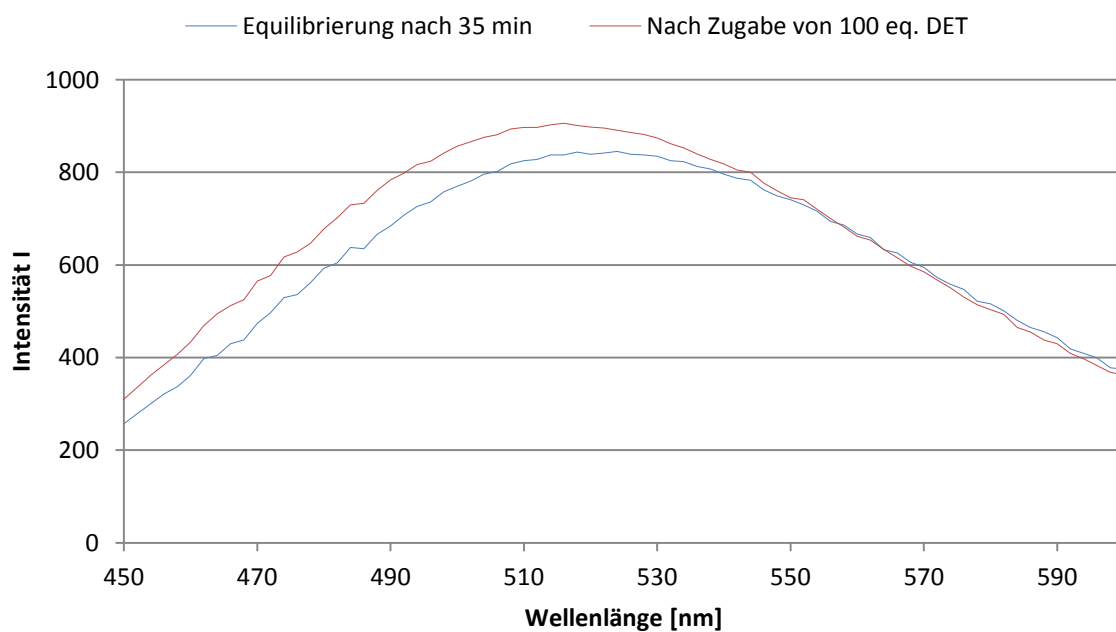


Abbildung 501: Emissionsspektren des FRET-Akzeptors 67 vor und nach Zugabe von 100 eq. DET (2.5 % in 50 % DMPC - 50 % DPPC).

- **Liposomen mit 25 % DMPC- und 75 % DPPC-Anteil**
 - **Dotierung mit 2.5 % der Transmembranbausteine 66 und 67**

1. Signaltransduktionsexperimente:

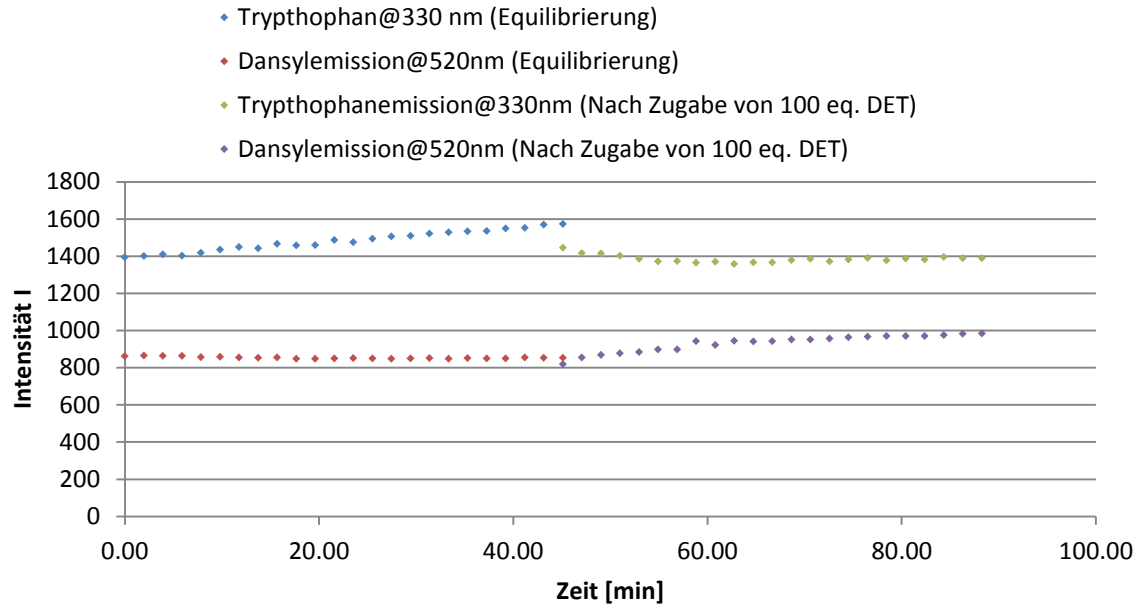


Abbildung 502: Zeitliche Änderung der Fluoreszenzintensität I vor und nach Zugabe von 100 eq. DET (5 % in 25 % DMPC – 75 % DPPC).

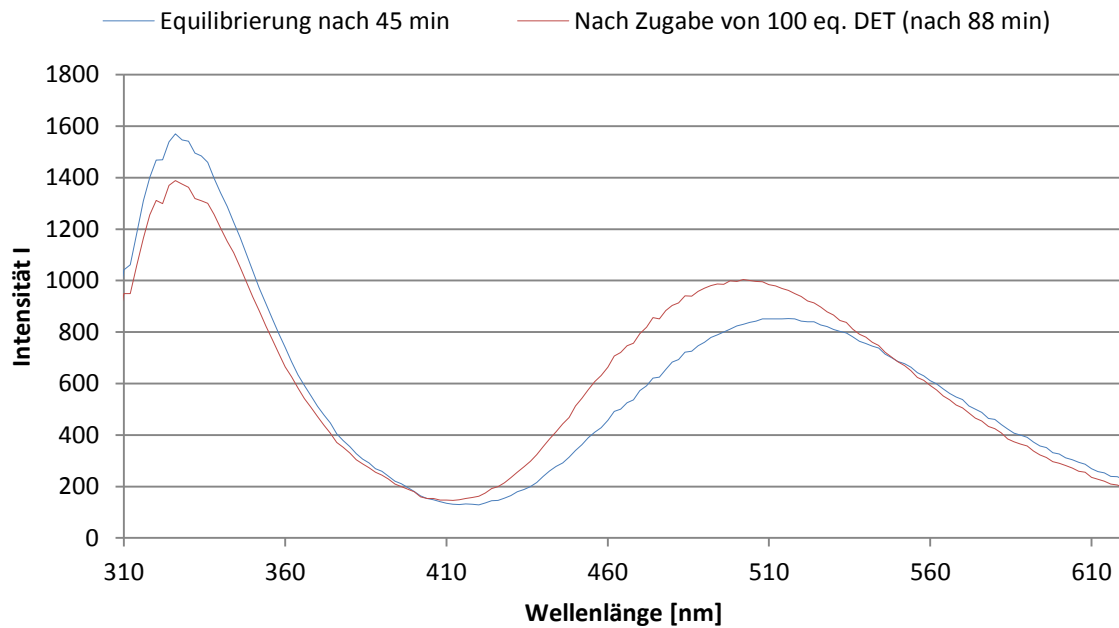


Abbildung 503: Emissionsspektren vor und nach Zugabe von 100 eq. DET (5 % in 25 % DMPC – 75 % DPPC).

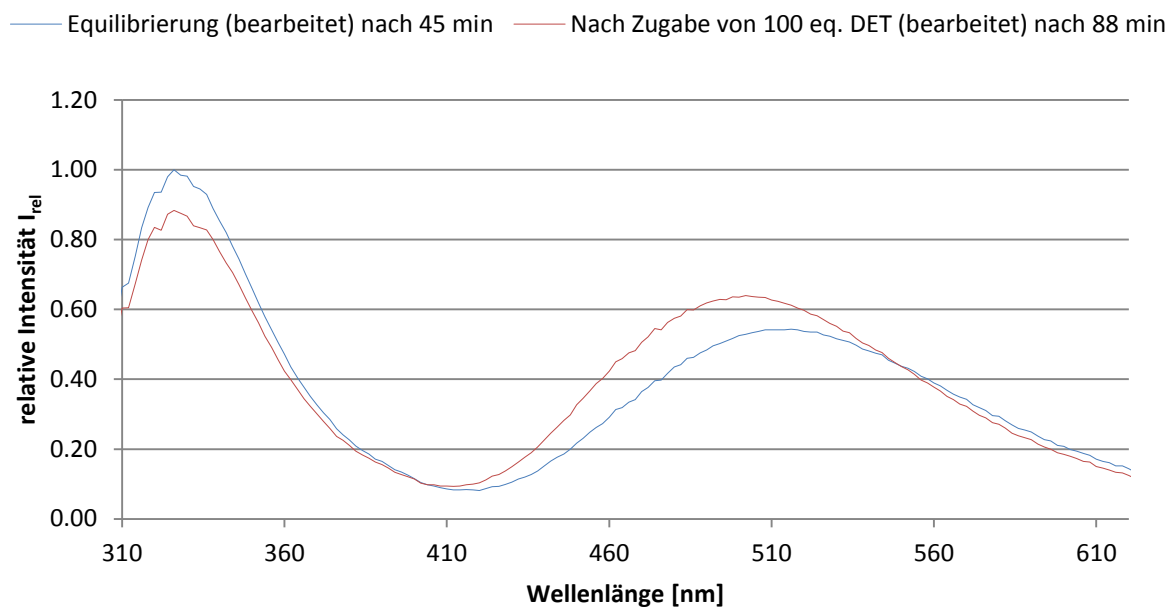


Abbildung 504: Änderung der relativen Intensitäten I_{rel} nach Zugabe von 100 eq. DET (5 % in 25 % DMPC – 75 % DPPC).

Tabelle 19: Prozentuale Änderung der relativen Intensitäten I_{rel} nach Zugabe von 100 eq. DET (5 % in 25 % DMPC – 75 % DPPC).

	Vor Zugabe von 100 eq. DET			Nach Zugabe von 100 eq. DET			proz. Änderung $\Delta\lambda_{max}$ (Em)/[nm]	
	λ_{max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität	λ_{max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität		
Tryptophan	326	1570	1	326	1388	0.88	-12%	0
Dansyl	508	851	0.54	502	1004	0.64	+10%	-6

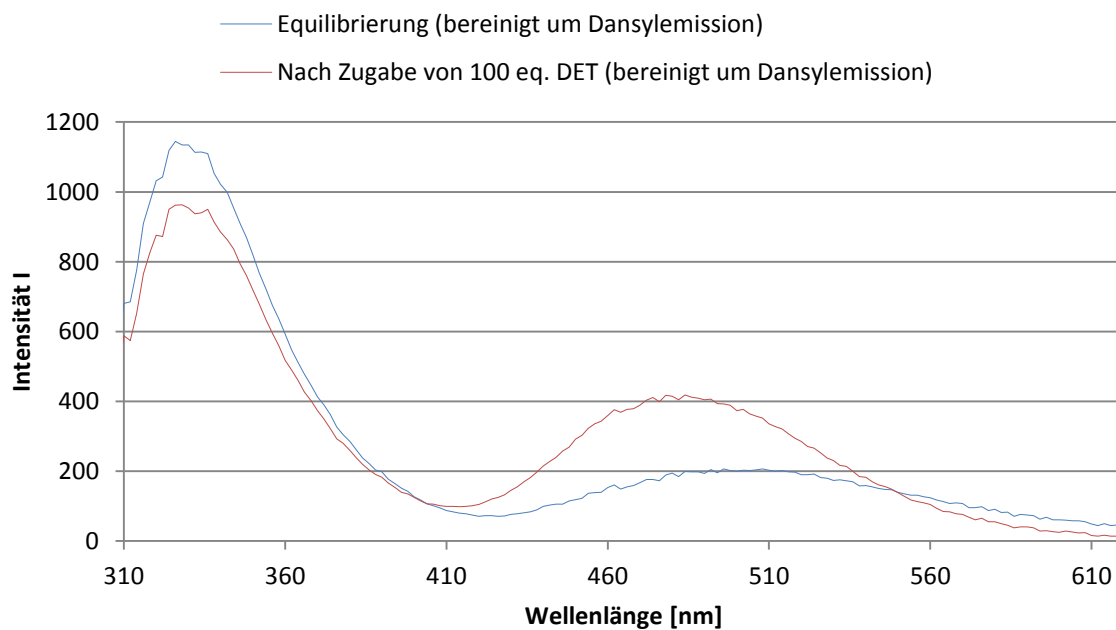


Abbildung 505: Um Dansylemission bereinigte Emissionsspektren ($\lambda_{Ex} = 280$ nm) vor und nach Zugabe von 100 eq. DET (5 % in 25 % DMPC – 75 % DPPC).

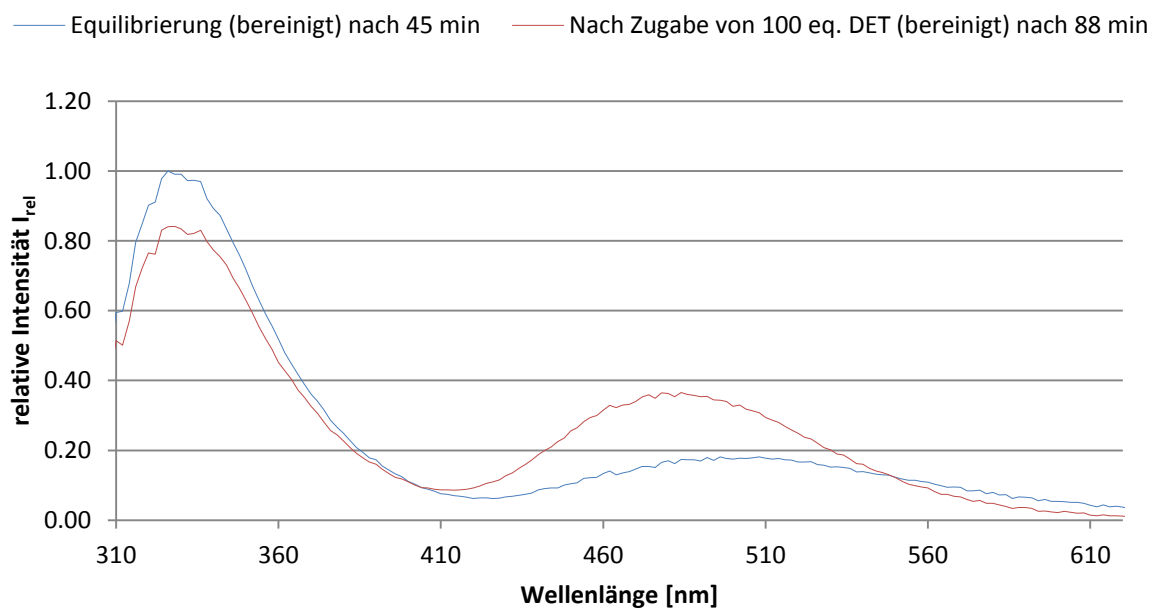


Abbildung 506: Änderung der relativen Intensitäten I_{rel} nach Zugabe von 100 eq. DET (um Dansylemission ($\lambda_{Ex} = 280$ nm) bereinigt) (5 % in 25 % DMPC – 75 % DPPC).

Tabelle 20: Änderung der bereinigten relativen Intensitäten I_{rel} nach Zugabe von 100 eq. DET (5 % in 25 % DMPC – 25 % DPPC).

	Vor Zugabe von 100 eq. DET			Nach Zugabe von 100 eq. DET			proz. Änderung $\Delta\lambda_{max}$ (Em)/[nm]	
	λ_{max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität	λ_{max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität		
Tryptophan	326	1144	1	326	962	0.84	-16%	0
Dansyl	508	207	0.18	484	418	0.37	+19%	-24

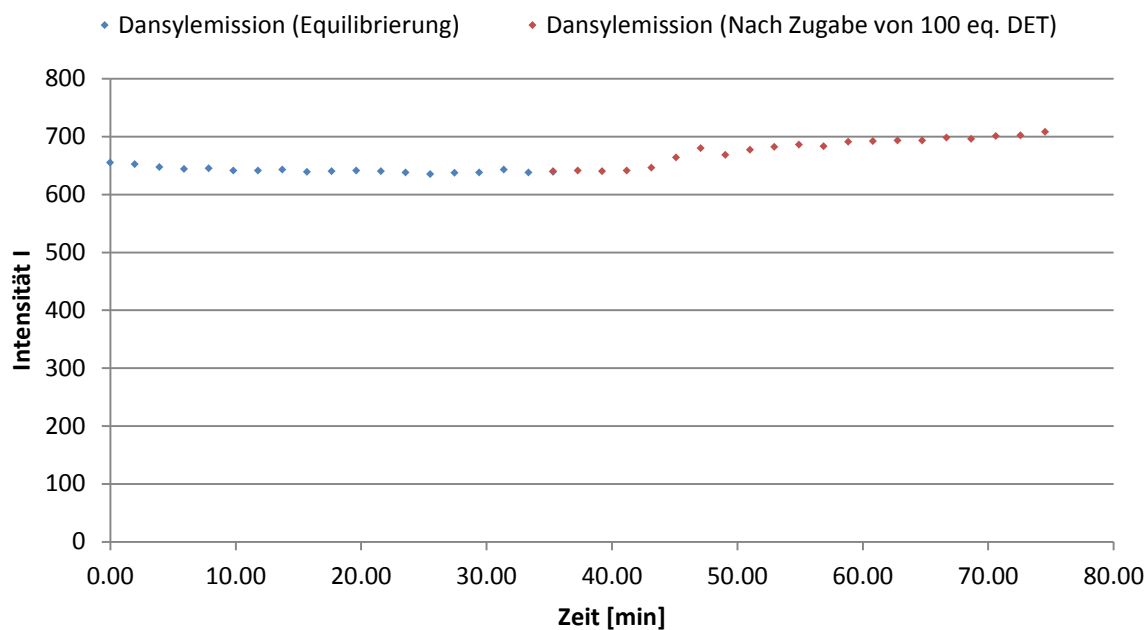
2. Kontrollexperimente:

Abbildung 507: Zeitliche Änderung der Akzeptor-Fluoreszenzintensität I vor und nach Zugabe von 100 eq. DET (2.5 % in 25 % DMPC - 75 % DPPC).

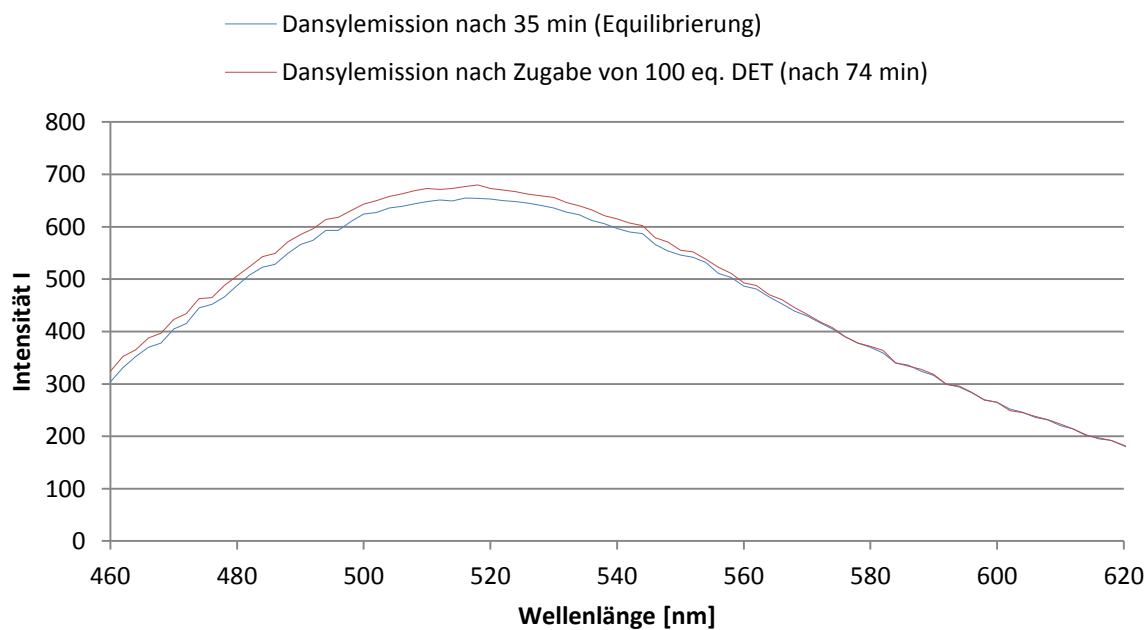


Abbildung 508: Emissionspektren des FRET-Akzeptors 67 vor und nach Zugabe von 100 eq. DET (2.5 % in 25 % DMPC - 75 % DPPC).

▪ Gegenüberstellung der Ergebnisse

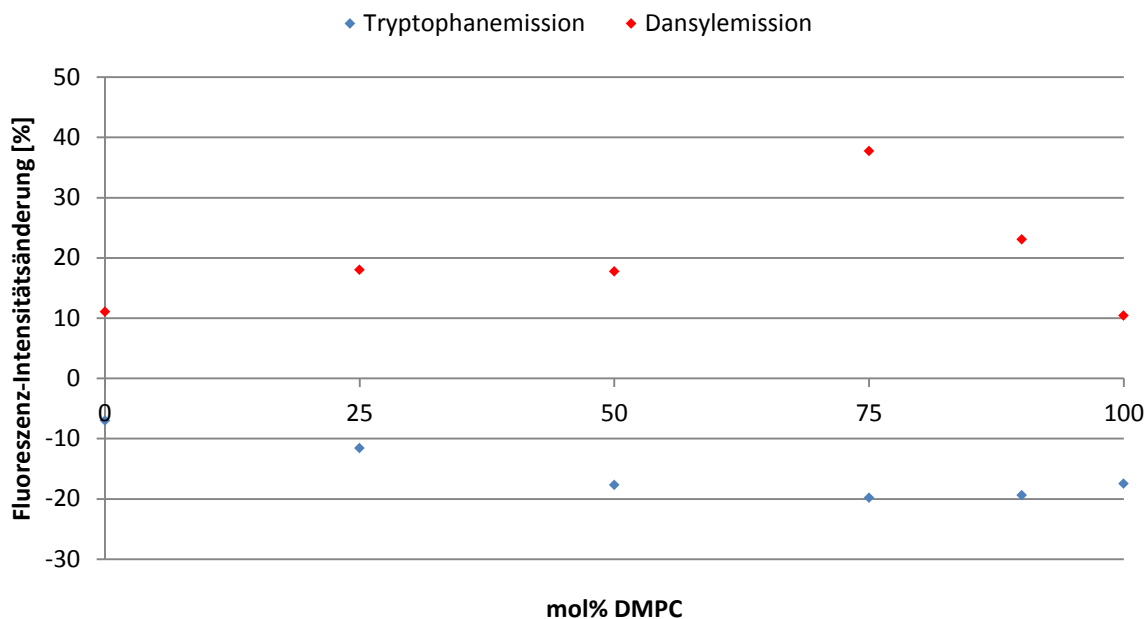


Abbildung 509: Fluoreszenzintensitätsänderung [%] in Abhängigkeit von der verwendeten Lipidmischung.

Tabelle 21: Zusammenfassung der Ergebnisse.

100 % DPPC:

	Vor Zugabe von 100 eq. DET			Nach Zugabe von 100 eq. DET			proz. Änderung $\Delta\lambda_{\max}(\text{Em})/[\text{nm}]$	
	$\lambda_{\max}(\text{Em})/[\text{nm}]$	abs. Intensität	rel. Intensität	$\lambda_{\max}(\text{Em})/[\text{nm}]$	abs. Intensität	rel. Intensität		
Tryptophan	328	1094	1	328	1017	0.93	-7%	0
Dansyl	520	389	0.356	508	513	0.469	+11%	-12

75 % DPPC – 25 % DMPC:

	Vor Zugabe von 100 eq. DET			Nach Zugabe von 100 eq. DET			proz. Änderung $\Delta\lambda_{\max}(\text{Em})/[\text{nm}]$	
	$\lambda_{\max}(\text{Em})/[\text{nm}]$	abs. Intensität	rel. Intensität	$\lambda_{\max}(\text{Em})/[\text{nm}]$	abs. Intensität	rel. Intensität		
Tryptophan	326	1570	1	326	1388	0.88	-12%	0
Dansyl	508	851	0.54	502	1004	0.64	+10%	-6

50 % DPPC – 50 % DMPC:

	Vor Zugabe von 100 eq. DET			Nach Zugabe von 100 eq. DET			proz. Änderung $\Delta\lambda_{\max}(\text{Em})/[\text{nm}]$	
	$\lambda_{\max}(\text{Em})/[\text{nm}]$	abs. Intensität	rel. Intensität	$\lambda_{\max}(\text{Em})/[\text{nm}]$	abs. Intensität	rel. Intensität		
Tryptophan	326	1760	1	326	1448	0.82	-18%	0
Dansyl	512	1073	0.61	494	1263	0.72	+11%	-18

25 % DPPC – 75 % DMPC:

	Vor Zugabe von 100 eq. DET			Nach Zugabe von 100 eq. DET			proz. Änderung $\Delta\lambda_{\max}(\text{Em})/[\text{nm}]$	
	$\lambda_{\max}(\text{Em})/[\text{nm}]$	abs. Intensität	rel. Intensität	$\lambda_{\max}(\text{Em})/[\text{nm}]$	abs. Intensität	rel. Intensität		
Tryptophan	326	1974	1	326	1582	0.80	-20%	0
Dansyl	516	1455	0.74	498	2004	1.02	+28%	-18

10 % DPPC – 90 % DMPC:

	Vor Zugabe von 100 eq. DET			Nach Zugabe von 100 eq. DET			proz. Änderung $\Delta\lambda_{\max}(\text{Em})/[\text{nm}]$	
	$\lambda_{\max}(\text{Em})/[\text{nm}]$	abs. Intensität	rel. Intensität	$\lambda_{\max}(\text{Em})/[\text{nm}]$	abs. Intensität	rel. Intensität		
Tryptophan	326	2479	1	326	1998	0.81	-19%	0
Dansyl	520	2185	0.88	502	2688	1.08	+20%	-12

5.4.4 Bestimmung der zur Signaltransduktion notwendigen DET- Konzentration

▪ Liposomenpräparation

Für die folgenden Experimente wurden Liposomen mit einer Dotierung von je 2.5 % der Transmembranbausteine **66** und **67** in einer Lipidmatrix aus DMPC/DPPC = 90:10 verwendet. Entsprechend der Tabelle 3 und Tabelle 4 wurden je 500 μL der Transmembranbausteinlösungen ($c = 10^{-4} \text{ mol/L}$) **66** und **67** mit 900 μL der DMPC-Stammlösung ($c = 2 \text{ mmol/L}$) und 100 μL DPPC-Stammlösung ($c = 2 \text{ mmol/L}$) versetzt. Das Gemisch wurde am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt und anschließend für min. 3 h gefriergetrocknet. Die resultierenden Filme wurden in 500 μL MES-Puffer (375 mmol, pH = 5.5) aufgenommen und für min. 1 min gevortext. Anschließend wurde die Liposomenlösung zur Herstellung unilamellarer Liposomen min. 19-mal (ungerade Anzahl an Extrusionszyklen) durch eine 200 nm Polycarbonatmembran extrudiert (Details: siehe 5.4).

▪ DET-Stammlösung

Durch Zugabe von Diethylentriamin trihydrochlorid (DET) sollen die beiden Bisphosphonat-Einheiten der Bausteine **66** und **67** durch Bildung eines ternären Komplexes und somit auch der FRET-Donor Tryptophan des Bausteins **66** die FRET-Akzeptor-Einheit Dansyl des Bausteins **67** in räumliche Nachbarschaft gebracht werden. Zur Ermittlung der hierfür erforderlichen Konzentration an Diethylentriamin trihydrochlorid (DET) sollen in einer Titrationsreihe 0.0 eq. – 75.0 eq. DET zu den zuvor präparierten Liposomen titriert werden. Da bei den späteren Fluoreszenzmessungen in einem Probenvolumen von 300 μL gearbeitet wird, ergibt sich für die zugesetzte Stoffmenge an Diethylentriamin trihydrochlorid:

Die resultierende Konzentration $c(\text{Lipid})$ des Liposomenmaterials beträgt $2 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$. Bei einer Dotierung mit je 2.5 % der Bausteine **66** und **67** ergibt sich somit eine Tryptophan/Dansyl-Konzentration $c(\text{Tryptophan})/c(\text{Dansyl}) = 5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$. Bei einem Probenvolumen von 300 μL beträgt die Stoffmenge $n(\text{Tryptophan})/n(\text{Dansyl}) = 1.5 \times 10^{-8} \text{ mol}$. Für die Bildung eines ternären 1:1:1-Komplexes aus den beiden Transmembranbausteinen **66** und **67** und Diethylentriamin trihydrochlorid ergibt sich für 1.0 eq. Diethylentriamin trihydrochlorid eine Stoffmenge $n(\text{DET}) = 1.5 \times 10^{-8} \text{ mol}$. Diese Stoffmenge sollte in einem Volumen von 5 μL zugegeben werden. Hieraus ergibt sich eine Konzentration von $c(\text{DET}) = 3 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$. Für die Stammlösung wurden 6.000 mg (0.033 mmol) Diethylentriamin trihydrochlorid (MW = 184.5 g/mol) in 1.084 mL MES-Puffer gelöst ($c = 300 \text{ mM}$) und auf das 10 fache verdünnt.

▪ Fluoreszenzmessungen

150 μL der wässrigen Liposomenlösung wurden in eine Microtiterplatte der Marke *Falcon Black Flat* überführt und die Lösung über einen Zeitraum von min. 30 min equilibriert und gleichzeitig auf 25 °C temperiert. Als Referenz wurde eine Basislinie (300-650 nm) gegen den verwendeten MES-Puffer **1** gemessen. Während der Equilibrierung wurde alle 90 sec ein Übersichtsspektrum (300-650 nm, Bandbreite 2 nm) gemessen und die Intensitätswerte der Emissionsmaxima des FRET-Donors **66** und des FRET-Akzeptors **67** bestimmt ($\lambda_{\text{Ex}} = 280 \text{ nm}$). Nach annähernder Konstanz der Intensitätsmaxima wurden 0.0 eq. – 75 eq. Diethylentriamin trihydrochlorid (DET) in MES-Puffer **1** zugegeben (vgl. Tabelle22). Wiederum wurde über einen Zeitraum von min. 30 min alle 90 s ein Übersichtsspektrum gemessen und die Intensitäten der Emissionsmaxima bestimmt. Die Messungen wurden über einen großen Wellenlängenbereich durchgeführt, um die Emissionsmaxima simultan verfolgen und eventuell auftretende Trübungserscheinungen ausschließen zu können.

Tabelle 22: Zugegebene Äquivalente DET trihydrochlorid (je 2.5 % **66** und **67** in DMPC/DPPC = 90 % - 10 %).

eq. DET	0.5	1.0	2.5	5.0	12.5	25.0	37.5	50.0	75.0
V(DMPC/DPPC) [μL]	150	150	150	150	150	150	150	150	150
V(MES-Puffer) [μL]	147.5	145	137.5	125	87.5	25	12.5	125	112.5
V (DET) [μL]	2.5	5	12.5	25	62.5	125	137.5	25*	37.5*
V (Gesamt) [μL]	300	300	300	300	300	300	300	300	300

▪ Signaltransduktionsexperimente

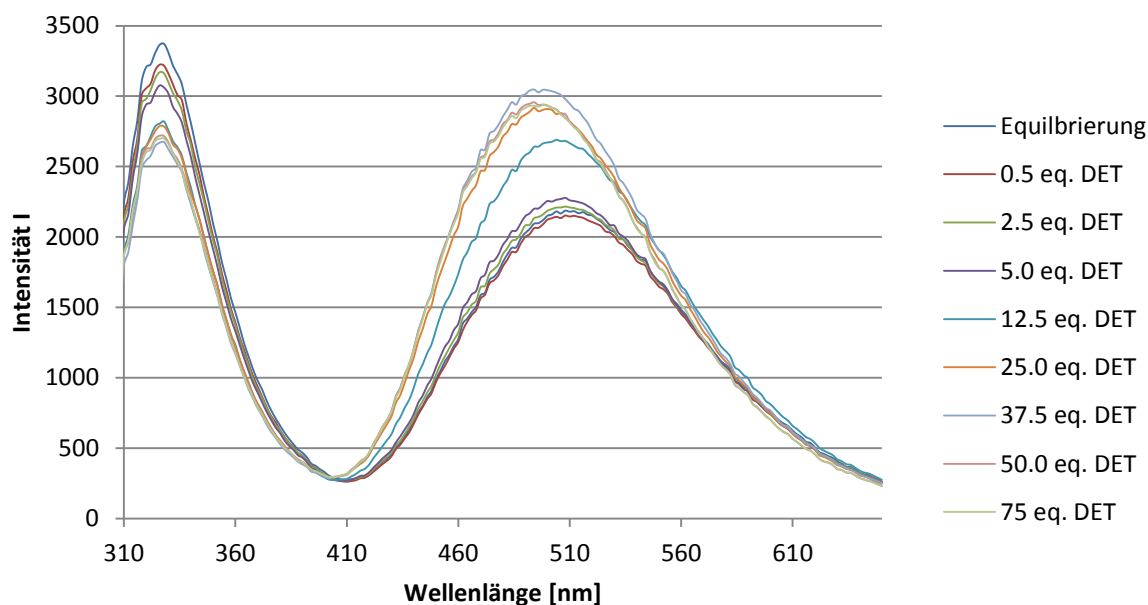


Abbildung 510: Titration mit 0.0 eq. – 75.0 eq. DET (je 2.5 % **66** und **67** in 90 % DMPC – 10 % DPPC) – Emissionsspektren.

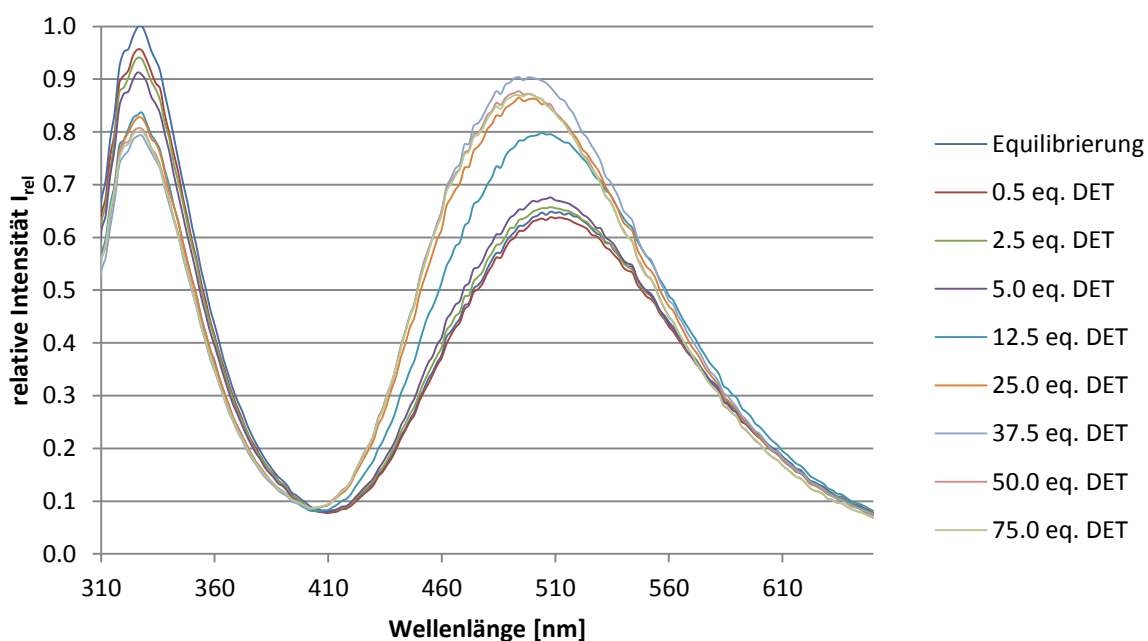


Abbildung 511: Titration mit 0.0 eq. - 75.0 eq. DET (je 2.5 % 66 und 67 in 90 % DMPC - 10 % DPPC) - relative Intensitäten.

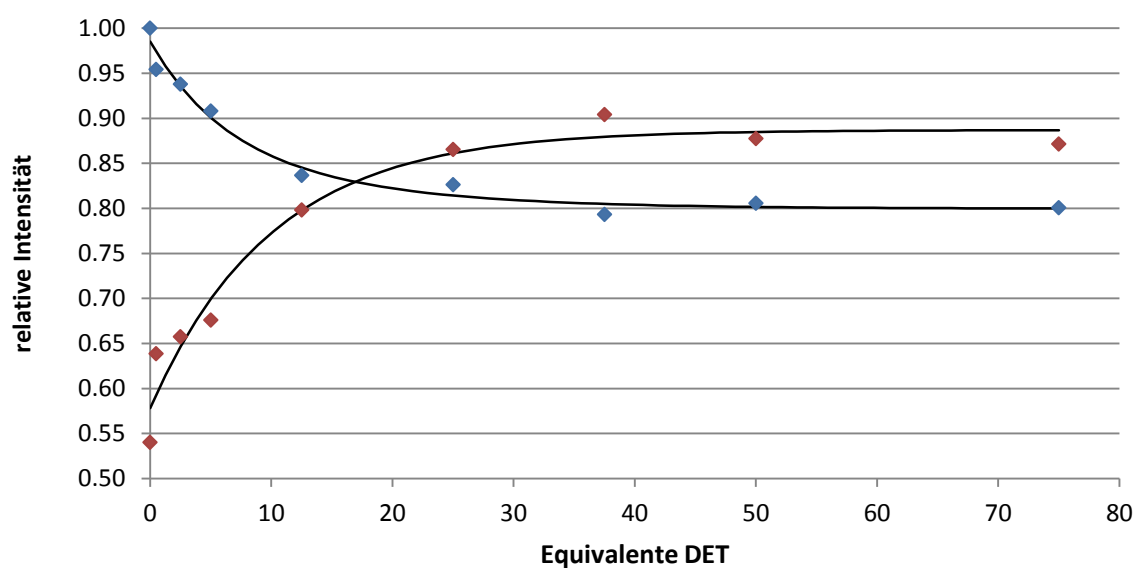


Abbildung 512: Relative Intensitätsänderung der Emissionsmaxima nach Zugabe von 0.0 eq. - 75.0 eq. DET (je 2.5 % 66 und 67 in 90 % DMPC - 10 % DPPC) - blau: 66; rot: 67.

	Vor Zugabe von 0 eq. DET			Nach Zugabe von 0 eq. DET				
	λ_{\max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität	λ_{\max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität	proz. Änderung	$\Delta\lambda_{\max}$ (Em)/[nm]
Tryptophan	328	3371	1.00	328	3371	1.00	0%	0
Dansyl	512	2183	0.54	512	2183	0.54	0%	0
	Vor Zugabe von 0.5 eq. DET			Nach Zugabe von 0.5 eq. DET				
	λ_{\max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität	λ_{\max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität	proz. Änderung	$\Delta\lambda_{\max}$ (Em)/[nm]
Tryptophan	328	3371	1.00	326	3216	0.95	-5%	0
Dansyl	512	2183	0.54	512	2150	0.64	+10%	0
	Vor Zugabe von 2.5 eq. DET			Nach Zugabe von 2.5 eq. DET				
	λ_{\max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität	λ_{\max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität	proz. Änderung	$\Delta\lambda_{\max}$ (Em)/[nm]
Tryptophan	328	3371	1.00	326	3161	0.94	-6%	0
Dansyl	512	2183	0.54	508	2216	0.66	+12%	-4
	Vor Zugabe von 5.0 eq. DET			Nach Zugabe von 5.0 eq. DET				
	λ_{\max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität	λ_{\max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität	proz. Änderung	$\Delta\lambda_{\max}$ (Em)/[nm]
Tryptophan	328	3371	1.00	326	3061	0.91	-9%	0
Dansyl	512	2183	0.54	508	2278	0.66	+22%	-4
	Vor Zugabe von 12.5 eq. DET			Nach Zugabe von 12.5 eq. DET				
	λ_{\max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität	λ_{\max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität	proz. Änderung	$\Delta\lambda_{\max}$ (Em)/[nm]
Tryptophan	328	3371	1.00	326	2820	0.84	-16%	0
Dansyl	512	2183	0.54	504	2690	0.80	+26%	-8
	Vor Zugabe von 25.0 eq. DET			Nach Zugabe von 25.0 eq. DET				
	λ_{\max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität	λ_{\max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität	proz. Änderung	$\Delta\lambda_{\max}$ (Em)/[nm]
Tryptophan	328	3371	1.00	326	2785	0.83	-17%	0
Dansyl	512	2183	0.54	500	2909	0.87	+33%	-12
	Vor Zugabe von 37.5 eq. DET			Nach Zugabe von 37.5 eq. DET				
	λ_{\max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität	λ_{\max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität	proz. Änderung	$\Delta\lambda_{\max}$ (Em)/[nm]
Tryptophan	328	3371	1.00	326	2673	0.79	-21%	0
Dansyl	512	2183	0.54	494	3047	0.90	+36%	-18
	Vor Zugabe von 50.0 eq. DET			Nach Zugabe von 50.0 eq. DET				
	λ_{\max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität	λ_{\max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität	proz. Änderung	$\Delta\lambda_{\max}$ (Em)/[nm]
Tryptophan	328	3371	1.00	326	2716	0.81	-19%	0
Dansyl	512	2183	0.54	494	2957	0.88	+34%	-18
	Vor Zugabe von 75.0 eq. DET			Nach Zugabe von 75.0 eq. DET				
	λ_{\max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität	λ_{\max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität	proz. Änderung	$\Delta\lambda_{\max}$ (Em)/[nm]
Tryptophan	328	3371	1.00	326	2699	0.80	-20%	0
Dansyl	512	2183	0.54	494	2932	0.87	+33%	-18

Tabelle 23: Zusammenfassung der Titration mit DET trihydrochlorid (je 2.5 % 66 und 67 in DMPC/DPPE = 90 % - 10 %).

5.4.5 Bestimmung der FRET-Effizienz dotierter Liposomen

Zur Abschätzung des maximal erzielbaren Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers für das System, bestehend aus den beiden Transmembranbausteinen **66** und **67** in einer DMPC/DPPC-Lipidmatrix (90 % - 10 %), wurde im folgenden Experiment die maximale FRET-Effizienz bezüglich der Donor-Emissions-Quenchung bestimmt. Hierzu wurden Liposomen (90 % DMPC - 10 % DPPC) mit einer konstanten Dotierung des Transmembranbausteins **66** (2.5 %) und einer steigenden Dotierung des Transmembranbausteins **67** (2.5 % - 5.0 %) präpariert und Signaltransduktionsexperimente entsprechend der Vorschrift 5.4 durchgeführt.

- **Liposomenpräparation**

Die Präparation der dotierten Liposomen erfolgte entsprechend der Vorschrift 5.4. Die eingesetzten Mengen an Stammlösungen des Liposomenmaterial und der Transmembranbausteine **66** und **67** können Tabelle 3 und Tabelle 4 entnommen werden. Die Dotierung mit dem Transmembranbaustein **67** wurde in Schritten von 0.5 % von 2.5 % - 5.0 % erhöht.

- **Fluoreszenzmessungen**

300 µL der wässrigen Liposomenlösungen wurden in eine Microtiterplatte der Marke *Falcon Black Flat* überführt und die Lösung über einen Zeitraum von min. 60 min equilibriert und gleichzeitig auf 25 °C temperiert. Als Referenz wurde eine Basislinie (300-650 nm) gegen den verwendeten MES-Puffer **1** gemessen. Während der Equilibrierung wurde alle 90 sec ein Übersichtsspektrum (300-650 nm, Bandbreite 2 nm) gemessen und die Intensitätswerte der Emissionsmaxima des FRET-Donors **66** und des FRET-Akzeptors **67** bestimmt ($\lambda_{\text{Ex}} = 280 \text{ nm}$). Nach annähernder Konstanz der Intensitätsmaxima wurden 50 eq. Diethylen-triamin trihydrochlorid (DET) zugegeben. Wiederum wurde über einen Zeitraum von min. 60 min alle 90 s ein Übersichtsspektrum gemessen und die Intensitäten der Emissionsmaxima bestimmt. Die Messungen wurden über einen großen Wellenlängenbereich durchgeführt, um die Emissionsmaxima simultan verfolgen und eventuell auftretende Trübungserscheinungen ausschließen zu können.

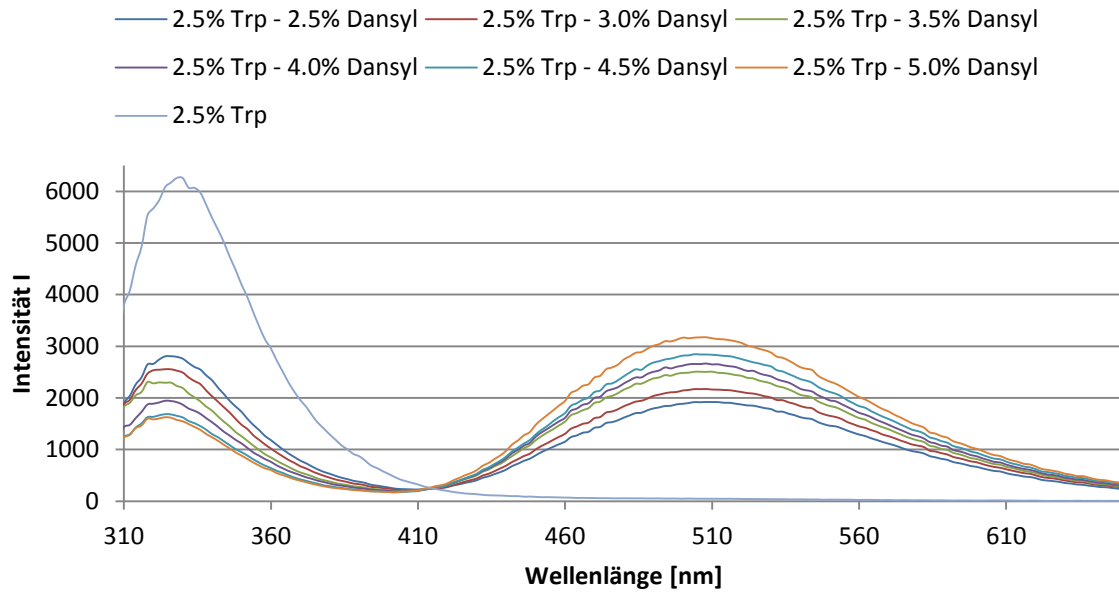


Abbildung 513: Emissionspektren 2.5 % 66- x % 67-dotierter Liposomen (90 % DMPC - 10 % DPPC) (Equilibrierung).

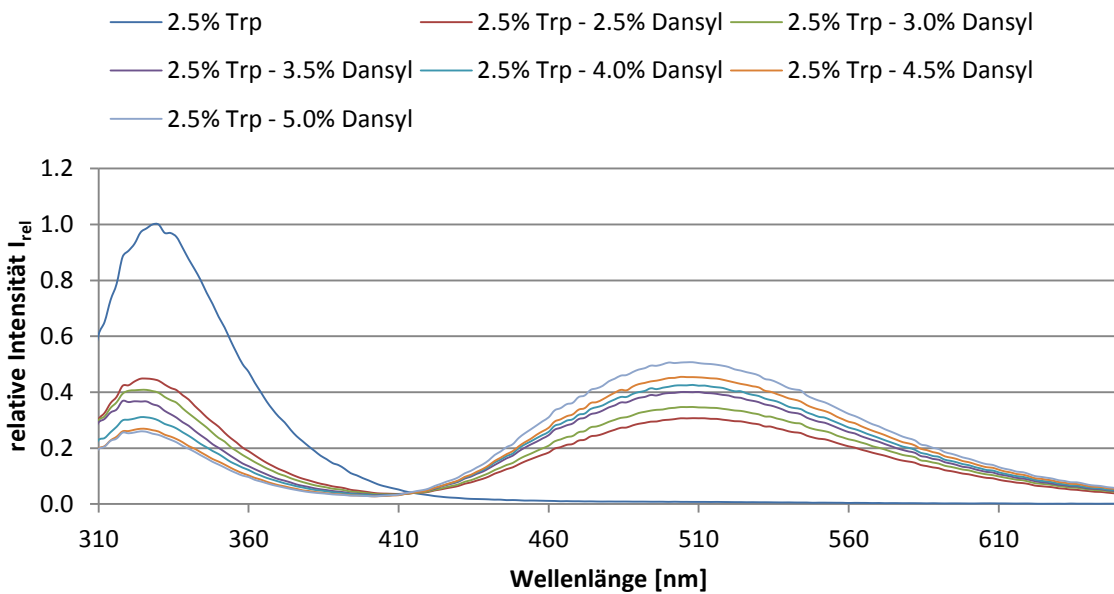


Abbildung 514: Emissionspektren 2.5 % 66- x % 67-dotierter Liposomen (90 % DMPC - 10 % DPPC) - relative Intensitäten I_{rel} (Equilibrierung).

Die Effizienz des Fluoreszenz-Energie-Transfers [%] wurde aus den Intensitäten der Tryptophan-Doner-Emission am Emissionsmaximum (330 nm) bestimmt. Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel:

$$E = 1 - I_{aus} E = F_0 - F/F_0 \quad (10)$$

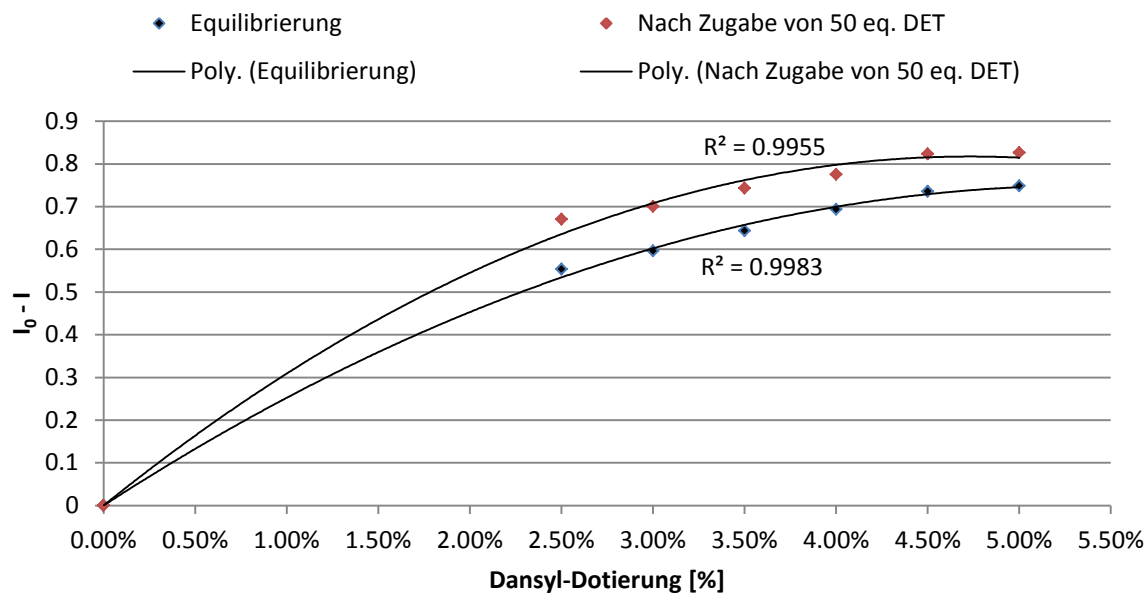


Abbildung 515: Änderung der Tryptophan-Donoremission (330 nm) in Abhängigkeit der Dansyl-Konzentration (2.5 % 66 – x % 67 in 90 % DMPC – 10 % DPPC) nach Zugabe von 50 eq. DET.

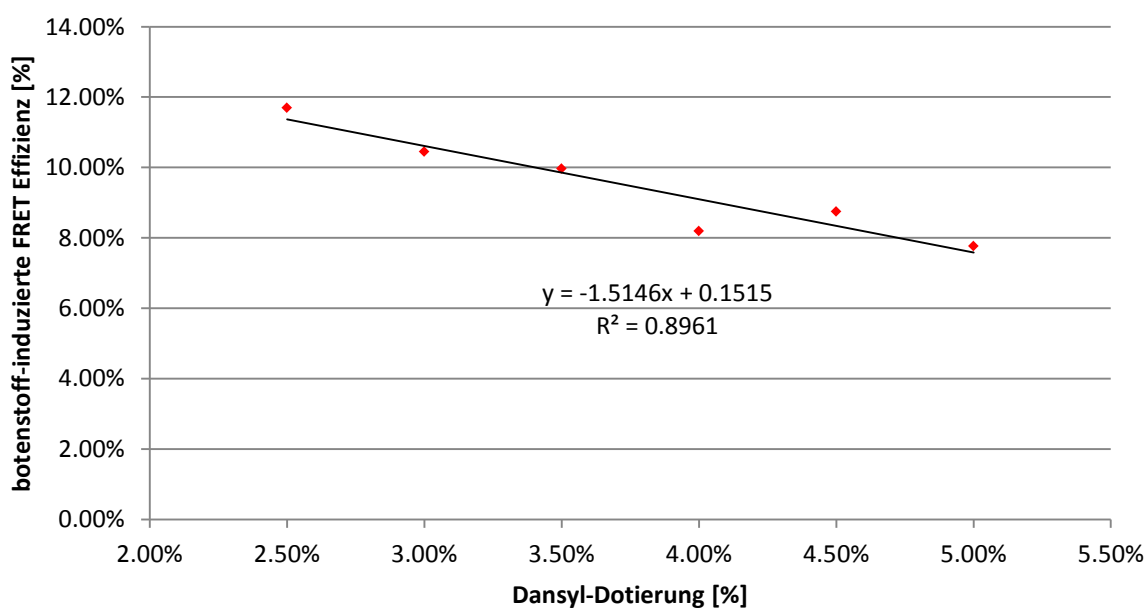


Abbildung 516: Botenstoff-induzierte Erhöhung der FRET-Effizienz in Abhängigkeit der Akzeptor-Dotierung.

Tabelle 24: FRET-Effizienz [%] in Abhängigkeit der Dansyl-Konzentration (2.5 % 66 – x % 67 in 90 % DMPC – 10 % DPPC).

Dotierung		relative Intensität I (328 nm)		FRET-Effizienz [%]		
Tryptophan	Dansyl	Equilibrierung	Nach 50 eq. DET	Equilibrierung	Nach 50 eq. DET	Zunahme
2.5%	0.0%	1.0	1.0	0.0%	0.0%	0.0%
2.5%	2.5%	0.446	0.33	55.3%	67.0%	11.7%
2.5%	3.0%	0.404	0.299	59.6%	70.1%	10.4%
2.5%	3.5%	0.357	0.257	64.3%	74.3%	10.0%
2.5%	4.0%	0.306	0.244	69.4%	77.6%	8.2%
2.5%	4.5%	0.264	0.177	73.6%	82.3%	8.8%
2.5%	5.0%	0.251	0.174	74.9%	82.6%	7.8%

5.4.6 Bestimmung der Einlagerungsgeometrie

In den folgenden Experimenten wurde der wasserlösliche Fluoreszenzfarbstoff Eosin Y als zusätzliche Fluoreszenzsonde eingesetzt, um die Einlagerungsgeometrie der Transmembranbausteine **66** und **67** in der Lipiddoppelschicht zu untersuchen. Eosin Y bildet mit der Dansylfunktion ein weiteres FRET-Paar (Dansyl: FRET-Donor; Eosin Y: FRET-Akzeptor). Die Konstellationen die sich für ein Multi-FRET-System, bestehend aus den drei Fluorophoren Tryptophan, Dansyl und Eosin Y **112** ergeben, sind in Kapitel 3.4.8.4.1 ausführlich beschrieben.

5.4.6.1 Multi-FRET-Experimente mit Eosin 112

- UV-VIS-Spektren von Eosin Y 112 in MES-Puffer (375 mmol, pH = 5.5)

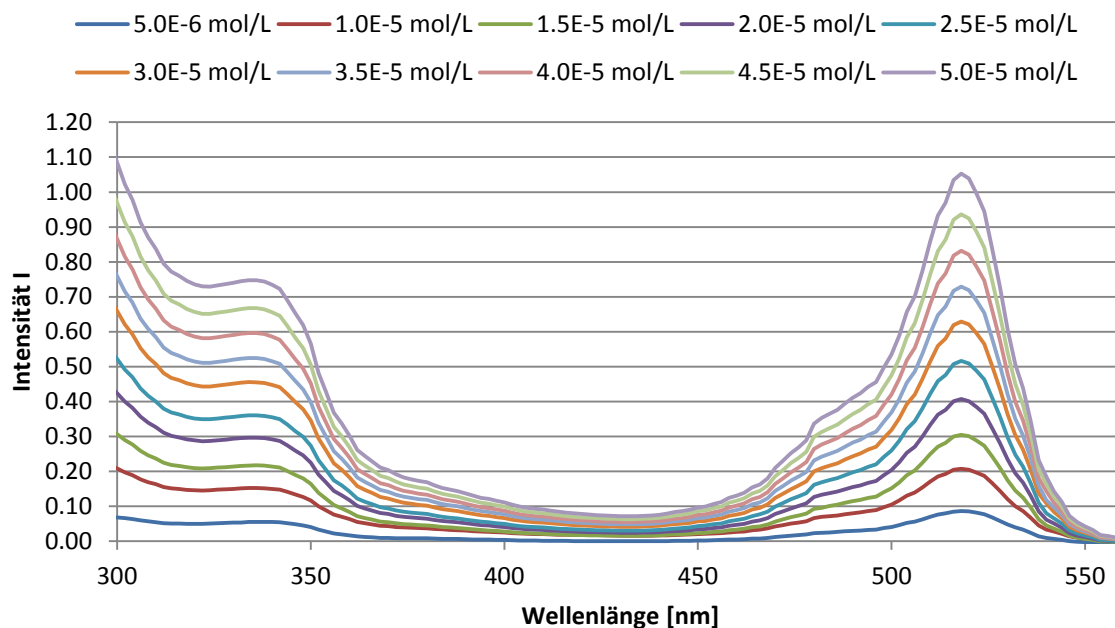


Abbildung 517: Absorptionsspektren von Eosin Y 112 (5×10^{-6} mol/L - 5×10^{-5} mol/L) in MES-Puffer (375 mmol/L, pH = 5.5).

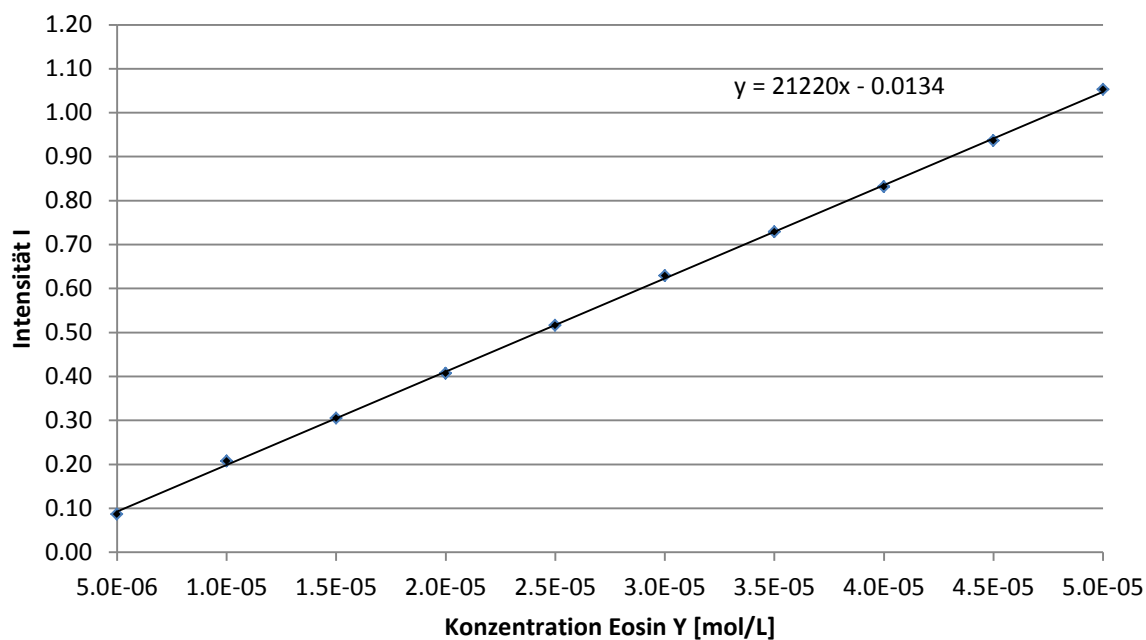


Abbildung 518: Intensitäten I am Absorptionsmaximum von Eosin Y ($\lambda_{\max} = 518 \text{ nm}$) in MES-Puffer (375 mmol/L, pH=5.5).

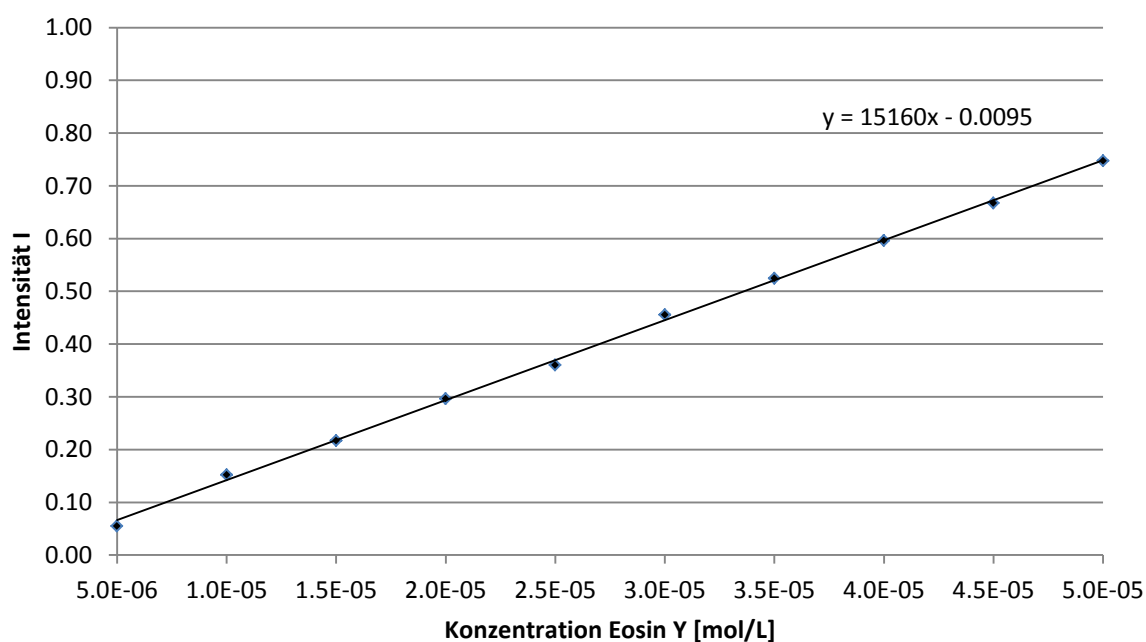


Abbildung 519: Intensitäten I am Absorptionsmaximum von Eosin Y ($\lambda_{\max} = 334 \text{ nm}$) in MES-Puffer (375 mmol/L, pH=5.5).

Tabelle 25: Zusammenfassung der UV-Vis-Daten von Eosin Y.

c [mol/L]	eq. (Eosin Y)	Intensität I ($\lambda=334 \text{ nm}$)	Intensität I ($\lambda=518 \text{ nm}$)	I(334 nm)/I(518 nm)
$5.0\text{E-}6$	0.1	0.0554	0.0866	0.640
$1.0\text{E-}5$	0.2	0.1525	0.2078	0.734
$1.5\text{E-}5$	0.3	0.2173	0.3051	0.712
$2.0\text{E-}5$	0.4	0.2968	0.407	0.729
$2.5\text{E-}5$	0.5	0.3606	0.5161	0.699
$3.0\text{E-}5$	0.6	0.4555	0.6294	0.724
$3.5\text{E-}5$	0.7	0.5247	0.7288	0.720
$4.0\text{E-}5$	0.8	0.5964	0.8316	0.717
$4.5\text{E-}5$	0.9	0.6675	0.9366	0.713
$5.0\text{E-}5$	1.0	0.7474	1.0526	0.710

5.4.6.2 Experimente mit externer Zugabe von Eosin 112

▪ Liposomenpräparation

Für die folgenden Experimente wurden Liposomen mit einer Dotierung von je 2.5 % der Transmembranbausteine **66** und **67** in einer Lipidmatrix aus DMPC/DPPC = 90:10 verwendet. Entsprechend der Tabelle 3 und Tabelle 4 wurden je 500 μL der Transmembranbausteinlösungen ($c = 10^{-4} \text{ mol/L}$) **66** und **67** mit 900 μL der DMPC-Stammlösung ($c = 2 \text{ mmol/L}$) und 100 μL DPPC-Stammlösung ($c = 2 \text{ mmol/L}$) versetzt. Das Gemisch wurde am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingeengt und anschließend für min. 3 h gefriergetrocknet. Die resultierenden Filme wurden in 500 μL MES-Puffer (375 mmol/L, pH = 5.5) aufgenommen und für min. 1 min gevortext. Anschließend wurde die Liposomenlösung zur Herstellung unilamellarer Liposomen min. 19 (ungerade Anzahl an Extrusionszyklen) mal durch eine 200 nm Polycarbonatmembran extrudiert (Details: siehe 5.4).

▪ Eosin Y-Stammlösungen

Die Fluoreszenz der extrazellulären Dansylgruppen soll durch Zugabe Eosin Y **112** vollständig gequencht werden. Hierzu sollen die zuvor präparierten Liposomen mit 0.1 – 1.0 eq. Eosin Y **112** (bezogen auf die Dansyl-Akzeptorkonzentration) in einer Titrationsreihe versetzt werden. Da bei den späteren Fluoreszenzmessungen in einem Probenvolumen von 300 μL gearbeitet wird, ergibt sich für die zugesetzten Stoffmengen an Eosin Y **112**:

Die resultierende Konzentration $c(\text{Lipid})$ des Liposomenmaterials beträgt $2 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$. Bei einer Dotierung mit 2.5 % des Bausteins **67** ergibt sich somit eine Dansyl-Konzentration $c(\text{Dansyl}) = 5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$. Bei einem Probenvolumen von 300 μL somit für die Stoffmenge $n(\text{Dansyl}) = 1.5 \times 10^{-8} \text{ mol}$. Somit ergibt sich für 0.1 eq. Eosin Y **112** eine Stoffmenge $n(\text{Eosin Y}) = 1.5 \times 10^{-9} \text{ mol}$. Diese Stoffmenge sollte in einem Volumen von 5 μL zugegeben werden. Hieraus ergibt sich eine Konzentration von $c(\text{Eosin Y}) = 3 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$. Für die Stammlösung wurden 20.756 mg Eosin Y **112** (MW = 691.89 g/mol) in 1 mL MES-Puffer **1** gelöst und auf das 100 fache verdünnt.

▪ Fluoreszenzmessungen

Um während der Fluoreszenzmessungen eine konstante Liposomenkonzentration zu gewährleisten, wurden die Proben entsprechend der folgenden Tabelle **26** in eine Microtiterplatte der Marke *Falcon Black Flat* pipetiert:

Tabelle 26: Probenvorbereitung der Eosin Y-Titration.

eq. Eosin Y	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
V(DMPC/DPPC) [μ L]	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150
V(MES-Puffer) [μ L]	145	140	135	130	125	120	115	110	105	100
V (Eosin Y) [μ L]	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
V (Gesamt) [μ L]	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300

Somit resultieren folgende Konzentrationen: $c(\text{Liposom}) = 2 \text{ mmol/L}$, $c(\mathbf{66}) = 5.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, $c(\mathbf{67}) = 5.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, $c(\text{Eosin Y}) = 5.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L} - 5.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$.

Die Lösungen wurden auf 25°C temperiert und über einen Zeitraum von min. 60 min equilibriert. Als Referenz wurde eine Basislinie (300-650 nm) gegen den verwendeten MES-Puffer **1** gemessen. Während der Equilibrierung wurde alle 90 sec ein Übersichtsspektrum (300-650 nm) gemessen und die Intensitätswerte der Emissionsmaxima des FRET-Donors **66**, des FRET-Akzeptors **67** und des Eosin Y **112** bestimmt ($\lambda_{\text{Ex}} = 280 \text{ nm}$). Nach annähernder Konstanz der Intensitätsmaxima wurden 100 eq. Diethylentriamin trihydrochlorid (DET) zugegeben. Wiederum wurde über einen Zeitraum von min. 60 min alle 90 s ein Übersichtsspektrum gemessen und die Intensitäten der Emissionsmaxima bestimmt. Die Messungen wurden über einen großen Wellenlängenbereich durchgeführt, um die Emissionsmaxima simultan verfolgen und eventuell auftretende Trübungserscheinungen ausschließen zu können.

Des Weiteren wurden zu jeder Messung Kontrollexperimente durchgeführt. Entsprechend der Dotierung wurden der FRET-Donor-Baustein **66** bzw. der FRET-Akzeptor-Baustein **67** jeweils einzeln in die entsprechende Liposomenmatrix eingelagert und die Messung unter identischen Bedingungen durchgeführt.

▪ Signaltransduktionsexperimente

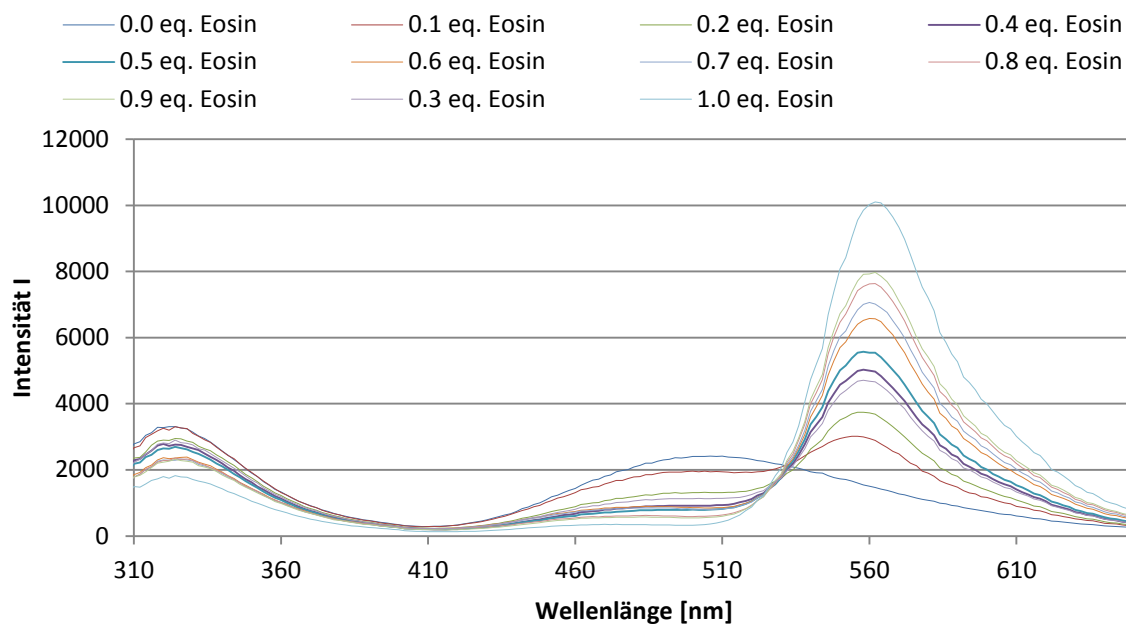


Abbildung 520: Fluoreszenzspektren nach externer Zugabe von 0.0 eq. - 1.0 eq. Eosin Y 112.

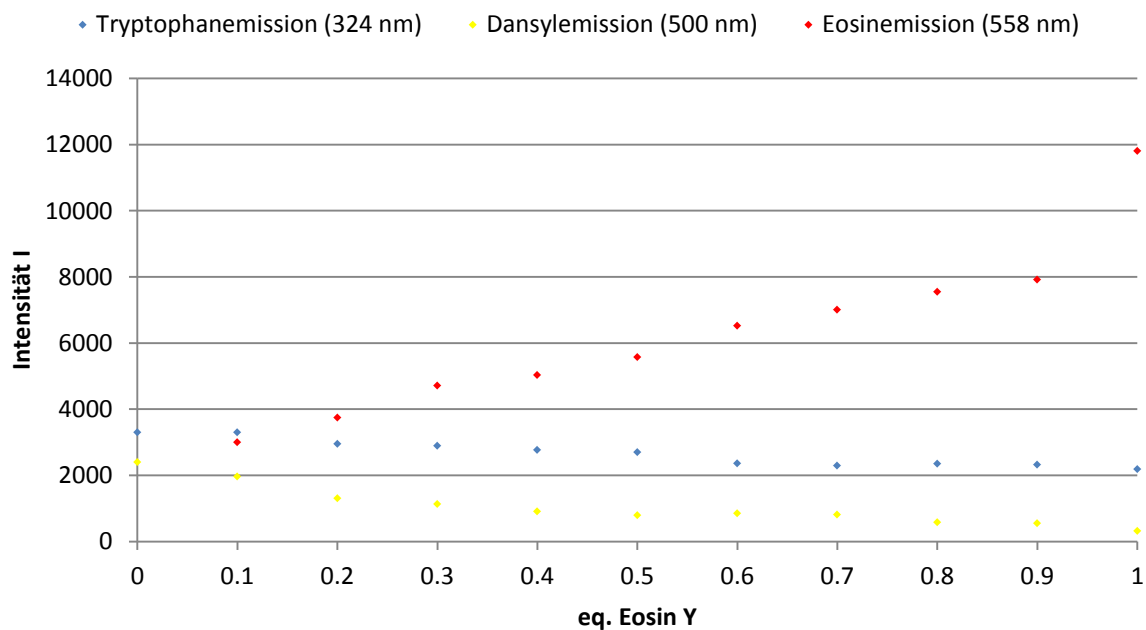


Abbildung 521: Intensitäten I der Emissionsmaxima nach externer Zugabe von 0.0 eq. - 1.0 eq. Eosin Y 112.

Tabelle 27: Intensitäten I der Emissionsmaxima nach externer Zugabe von 0.0 eq. - 1.0 eq. Eosin Y 112.

eq. Eosin Y	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
Tryptophanemission (324 nm)	3303	3305	2953	2897	2769	2697	2360	2295	2357	2322	2186
Dansylemission (500 nm)	2402	1965	1310	1129	913	795	856	813	585	550	318
Eosinemission (558 nm)		3001	3745	4714	5034	5574	6520	7005	7547	7916	11810

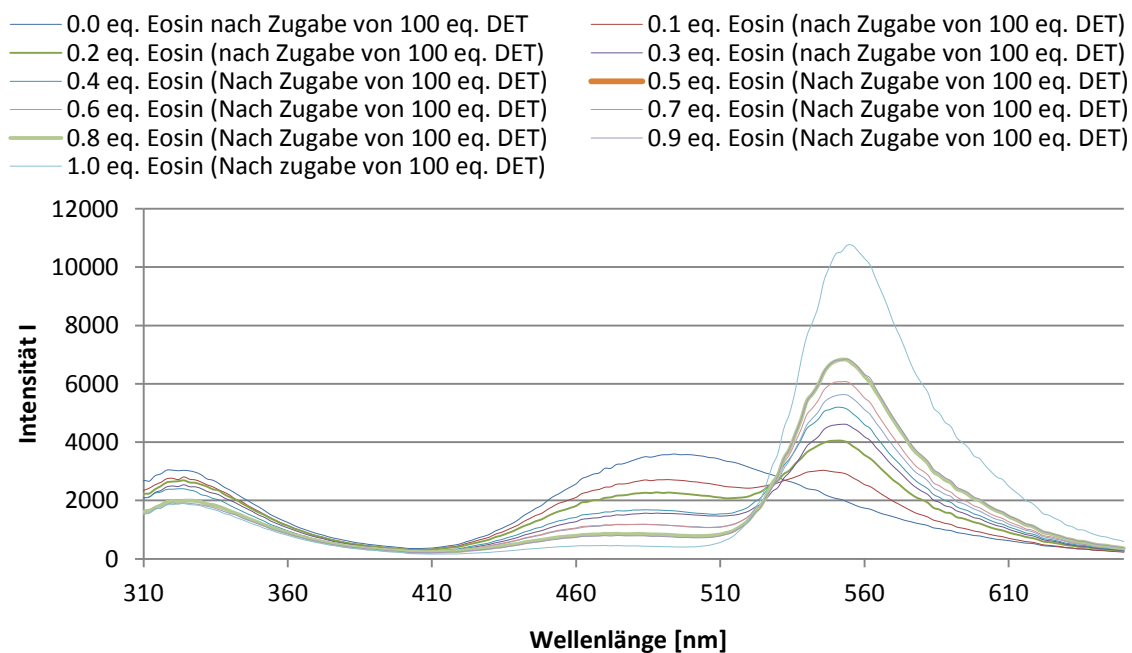


Abbildung 522: Fluoreszenzspektren in Gegenwart von 0.0 eq. - 1.0 eq. Eosin Y 112 (Nach Zugabe von 100 eq. DET).

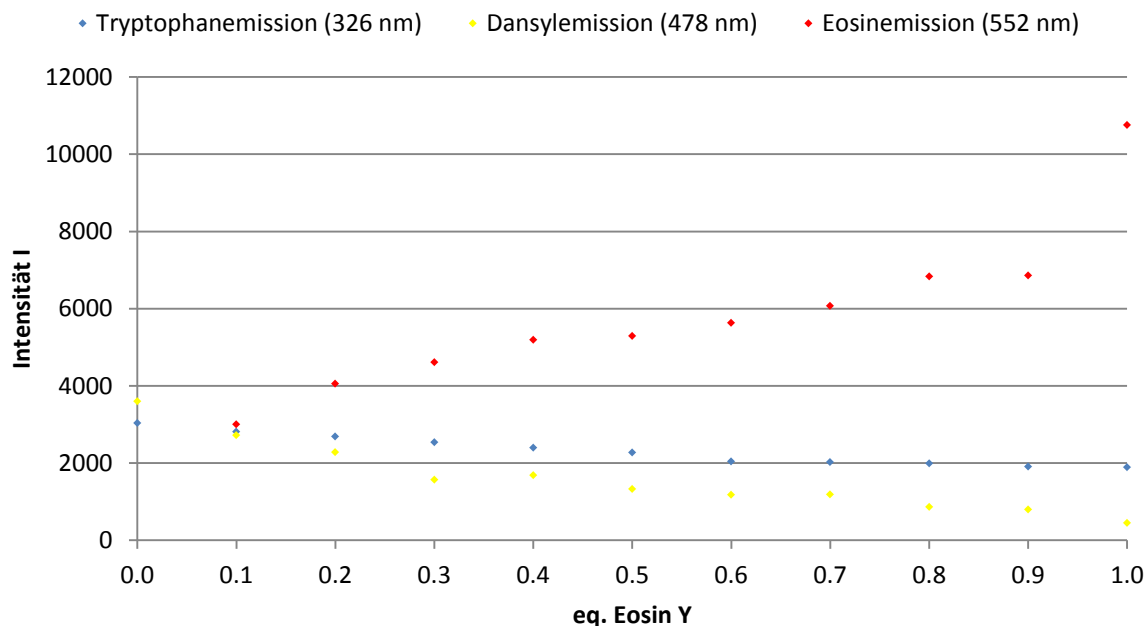


Abbildung 523: Intensitäten I der Emissionsmaxima in Gegenwart von 0.0 eq. - 1.0 eq. Eosin Y 112 (Nach Zugabe von 100 eq. DET).

Tabelle 28: Intensitäten I der Emissionsmaxima in Gegenwart von 0.0 eq. - 1.0 eq. Eosin Y 112 (Nach Zugabe von 100 eq. DET).

eq. Eosin Y	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
Tryptophanemission (324 nm)	3033	2807	2689	2538	2399	2270	2039	2025	1985	1909	1893
Dansylemission (500 nm)	3595	2715	2280	1566	1681	1324	1180	1182	860	798	445
Eosinemission (558 nm)		3000	4051	4612	5192	5292	5626	6071	6830	6853	10750

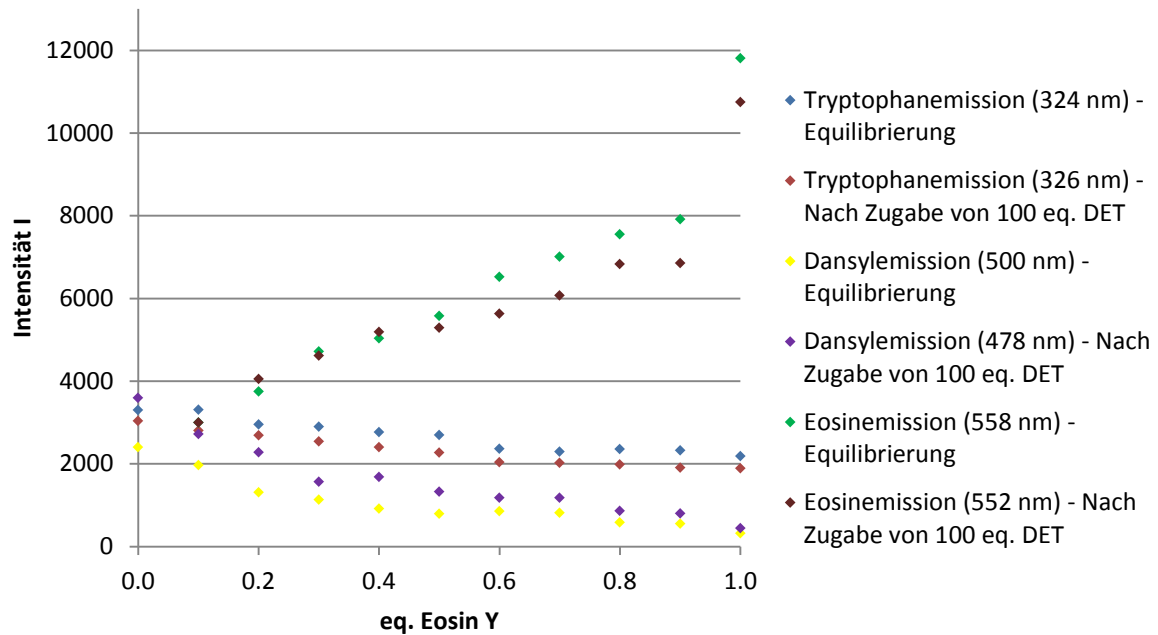


Abbildung 524: Signaltransduktion in Gegenwart von 0.0 eq. - 1.0 eq. Eosin Y 112 (Intensitäten I der Emissionsmaxima).

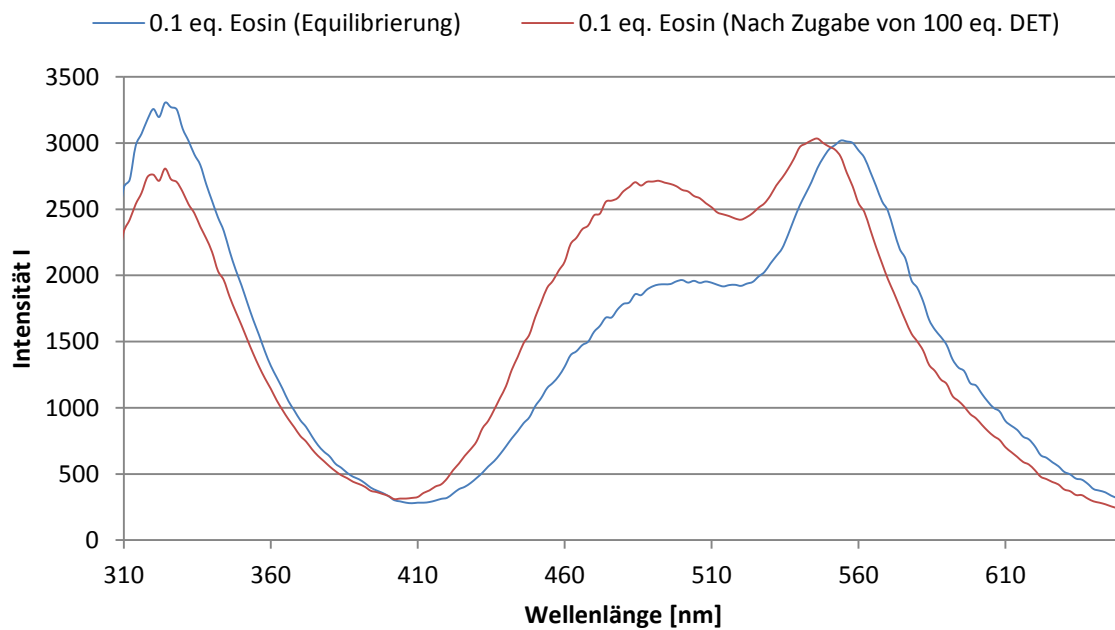


Abbildung 525: Signaltransduktionsexperiment (2.5 % 66 - 2.5 % 67 in DMPC/DPPC = 90 % - 10 %) in Gegenwart von 0.1 eq. Eosin Y 112 (extern).

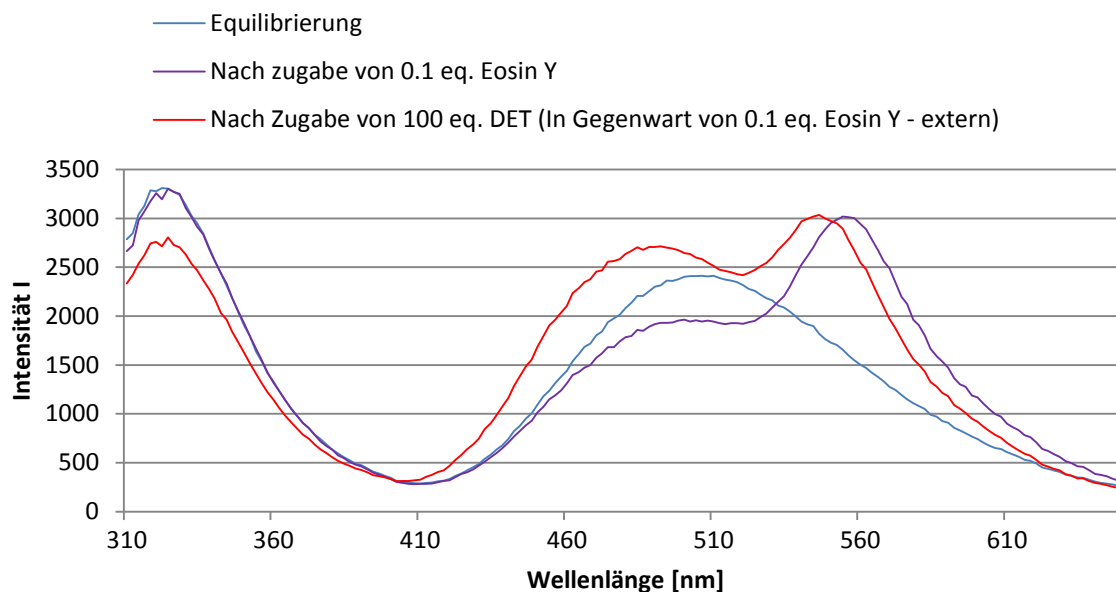


Abbildung 526: Signaltransduktionsexperiment (2.5 % 66 - 2.5 % 67 in DMPC/DPPC = 90 % - 10 %) in Gegenwart von 0.1 eq. Eosin Y 112 (extern).

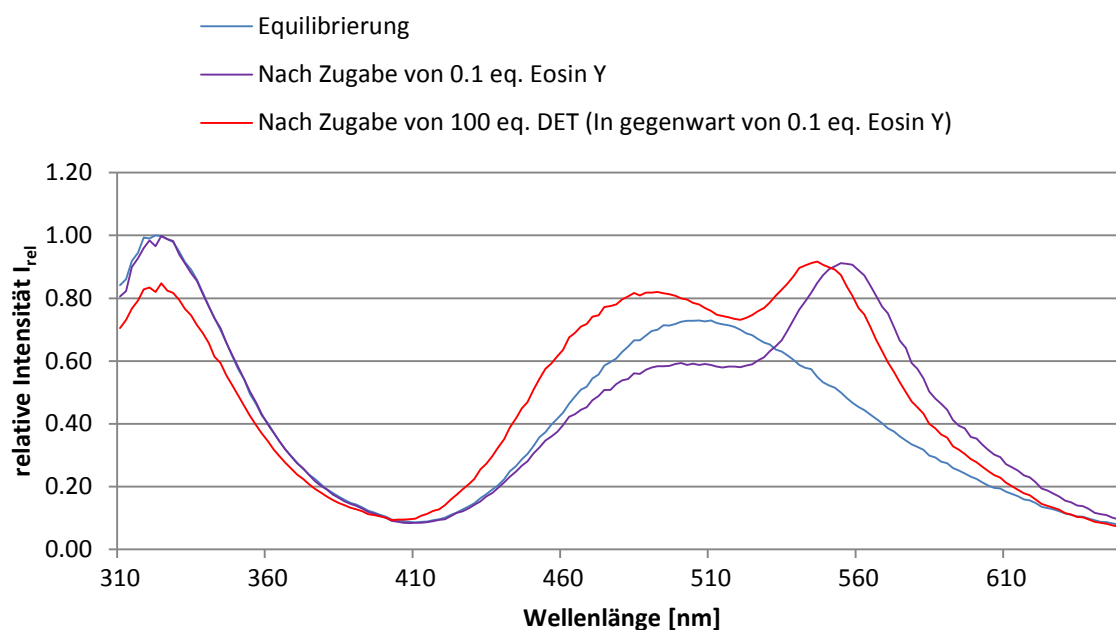


Abbildung 527: Signaltransduktionsexperiment (2.5 % 66 - 2.5 % 67 in DMPC/DPPC = 90 % - 10 %) in Gegenwart von 0.1 eq. Eosin Y 112 (extern) - relative Intensitäten I_{rel} .

Tabelle 29: Zusammenfassung der Experimente mit externer Zugabe von Eosin Y 112 (0.1 eq.).

	eq. Eosin Y	Trp (330 nm)	Dan (520 nm)	Eos (556 nm)
Equilibrierung	0.0	1,00	0,73	-
Nach Zugabe von 100 eq. DET	0.0	0,91	1,09	-
Änderung [%]		-9%	36%	-
Equilibrierung	0.1	0,97	0,59	0,91
Nach Zugabe von 100 eq. DET	0.1	0,82	0,82	0,92
Änderung [%]		-15%	13%	1%

▪ Kontrollexperimente

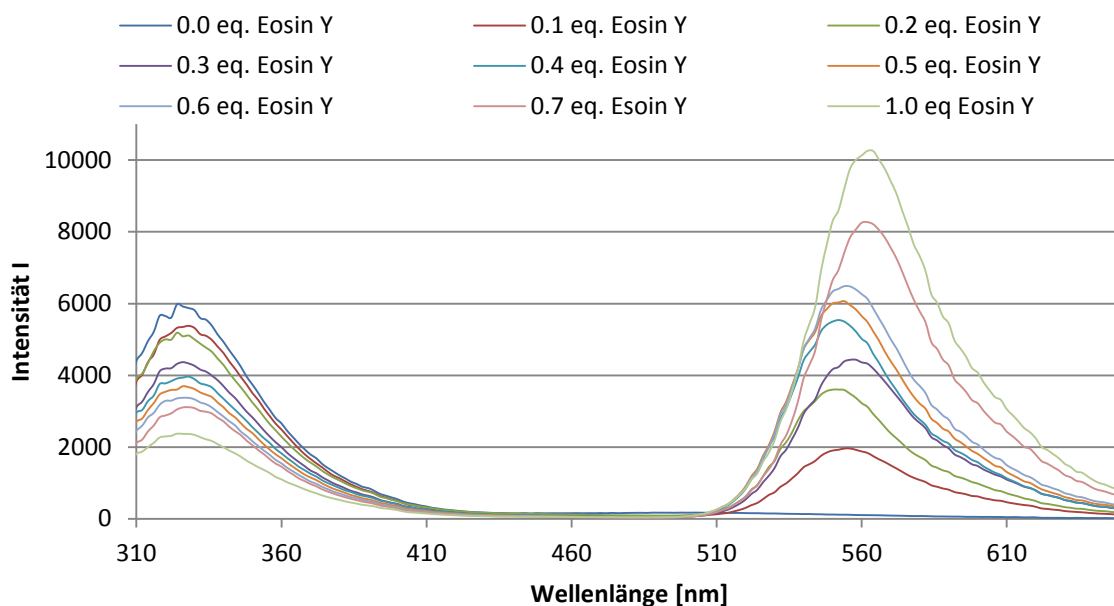


Abbildung 528: Fluoreszenzspektren von Rezeptor 66 in 90 % DMPC - 10 % DPPC in Gegenwart von 0.0 eq. - 1.0 eq Eosin Y 112 ($\lambda_{EX} = 280$ nm).

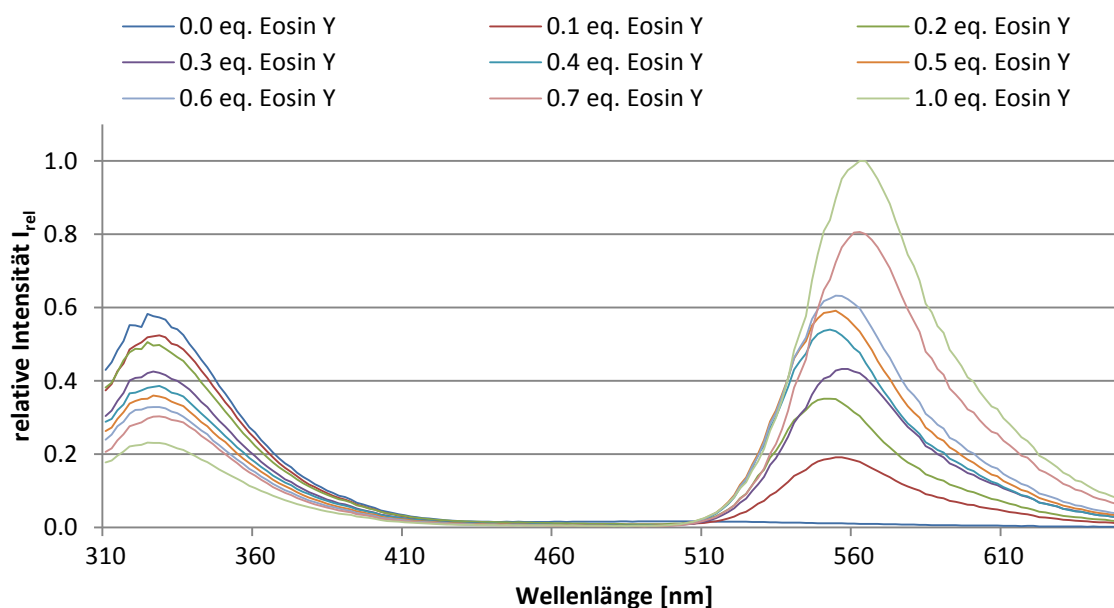


Abbildung 529: Fluoreszenzspektren von Rezeptor 66 in 90 % DMPC - 10 % DPPC in Gegenwart von 0.0 eq. - 1.0 eq Eosin Y 112 ($\lambda_{EX} = 280$ nm) – relative Intensitäten I_{rel} .

Tabelle 30: Zusammenfassung des Kontrollexperiments 2.5 % 66 in DMPC/DPPC (90 % - 10 %) mit Eosin Y 112.

Dotierung		Emission (324 nm)			Emission (562 nm)		
Tryptophan	eq. Eosin Y	I	I_{rel}	Änderung [%]	I	I_{rel}	Änderung [%]
2.5%	0.0	5980	0.58	-	107	0.01	-
2.5%	0.1	5324	0.52	-6	1840	0.18	17
2.5%	0.2	5188	0.51	-7	3123	0.30	29
2.5%	0.3	4320	0.42	-16	4325	0.42	41
2.5%	0.4	3913	0.38	-20	4892	0.48	47
2.5%	0.5	3607	0.35	-23	5485	0.53	52
2.5%	0.6	3359	0.33	-25	6131	0.60	59
2.5%	0.7	3052	0.30	-28	8269	0.81	80
2.5%	1.0	2376	0.32	-35	10254	1.00	99

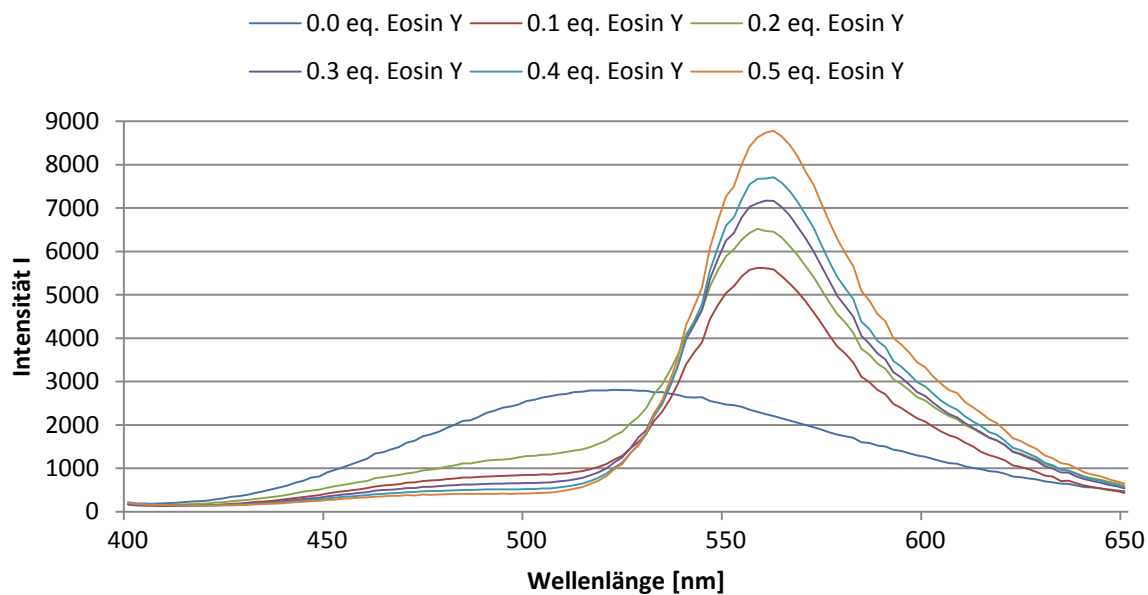


Abbildung 530: Fluoreszenzspektren von Rezeptor 67 in 90 % DMPC - 10 % DPPC in Gegenwart von 0.0 eq. - 0.5 eq. Eosin Y 112 ($\lambda_{\text{EX}} = 330 \text{ nm}$).

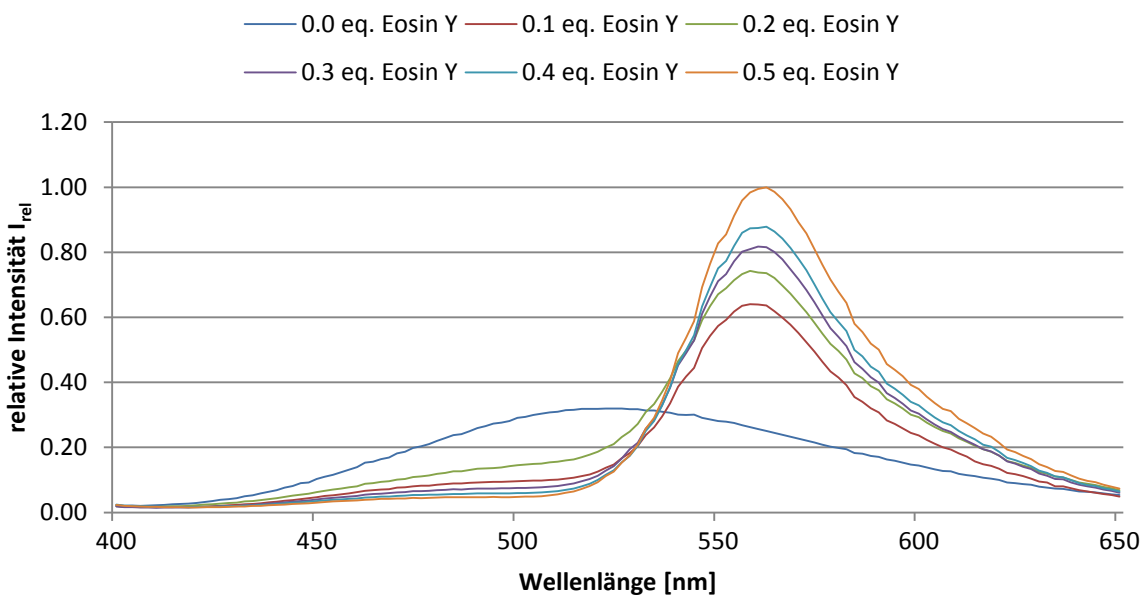


Abbildung 531: Fluoreszenzspektren von Rezeptor 67 in 90 % DMPC - 10 % DPPC in Gegenwart von 0.0 eq. - 0.5 eq. Eosin Y 112 ($\lambda_{\text{EX}} = 330 \text{ nm}$) - relative Intensitäten I_{rel} .

Tabelle 31: Zusammenfassung des Kontrolllexperiments 2.5 % 67 in DMPC/DPPC (90 % - 10 %) mit Eosin Y 112.

Dotierung		Emission (520 nm)			Emission (556 nm)		
Dansyl	eq. Eosin Y	I	I_{rel}	Änderung [%]	I	I_{rel}	Änderung [%]
2.5%	0.0	2809	0.32	-	2352	0.26	-
2.5%	0.1	805	0.09	-23%	5624	0.64	38%
2.5%	0.2	1148	0.13	-19%	6522	0.74	48%
2.5%	0.3	633	0.07	-25%	7175	0.82	56%
2.5%	0.4	506	0.06	-26%	7713	0.88	62%
2.5%	0.5	410	0.05	-27%	8779	1.0	74%

5.4.7 Ausschluss eines interzellulären Energie-Transfers

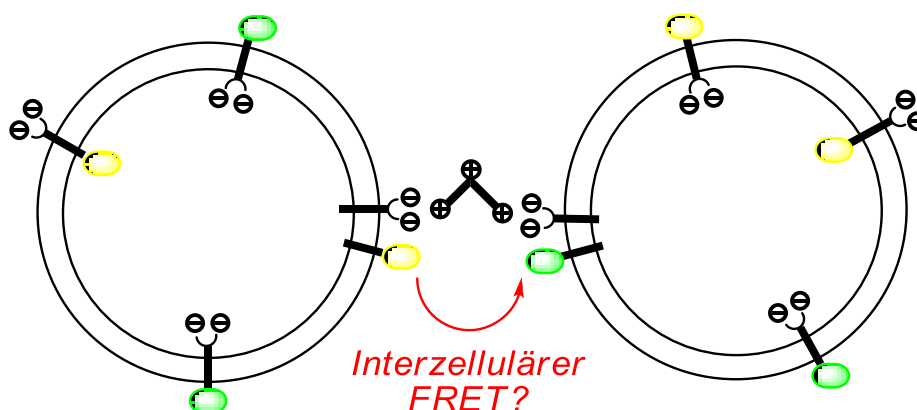


Abbildung 532: Schematische Darstellung eines interzellulären Energie-Transfers.

▪ Liposomenpräparation

Für die folgenden Experimente wurden zwei getrennte Liposomenlösungen (a) und (b) mit einer Dotierung von 5 % der Transmembranbausteine **66** (a) bzw. **67** (b) in einer Lipidmatrix aus DMPC/DPPC = 75 % - 25 % verwendet. Entsprechend der Tabelle 3 und Tabelle 4 wurden je 1000 μL der Transmembranbausteinlösungen ($c = 10^{-4} \text{ mol/L}$) **66** bzw. **67** mit jeweils 750 μL der DMPC-Stammlösung ($c = 2 \text{ mmol/L}$) und jeweils 250 μL DPPC-Stammlösung ($c = 2 \text{ mmol/L}$) versetzt. Die Gemische wurden am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt und anschließend für min. 3 h gefriergetrocknet. Die resultierenden Filme wurden in je 1000 μL MES-Puffer (375 mmol, pH = 5.5) aufgenommen und für min. 1 min gevortext. Anschließend wurden die Liposomenlösungen zur Herstellung unilamellarer Liposomen min. 19-mal (ungerade Anzahl an Extrusionszyklen) durch eine 200 nm Polycarbonatmembran extrudiert (Details: siehe 5.4).

▪ Fluoreszenzmessungen

Jeweils 150 μL der wässrigen Liposomenlösungen wurden in eine Microtiterplatte der Marke *Falcon Black Flat* überführt und die Lösung über einen Zeitraum von min. 30 min equilibriert und gleichzeitig auf 25 °C temperiert. Als Referenz wurde eine Basislinie (300-650 nm) gegen den verwendeten MES-Puffer **1** gemessen. Während der Equilibrierung wurde alle 90 sec ein Übersichtsspektrum (300-650 nm, Bandbreite 2 nm) gemessen und die Intensitätswerte der Emissionsmaxima des FRET-Donors **66** und des FRET-Akzeptors **67** bestimmt ($\lambda_{\text{Ex}} = 280 \text{ nm}$). Nach annähernder Konstanz der Intensitätsmaxima wurden 100 eq. Diethylentriamin trihydrochlorid (DET) in MES-Puffer **1** zugegeben (vgl. Tabelle 22). Wiederum wurde über einen Zeitraum von min. 30 min alle 90 s ein Übersichtsspektrum gemessen und die Intensitäten der Emissionsmaxima bestimmt. Die Messungen wurden über einen großen Wellenlängen-

bereich durchgeführt, um die Emissionsmaxima simultan verfolgen und eventuell auftretende Trübungserscheinungen ausschließen zu können.

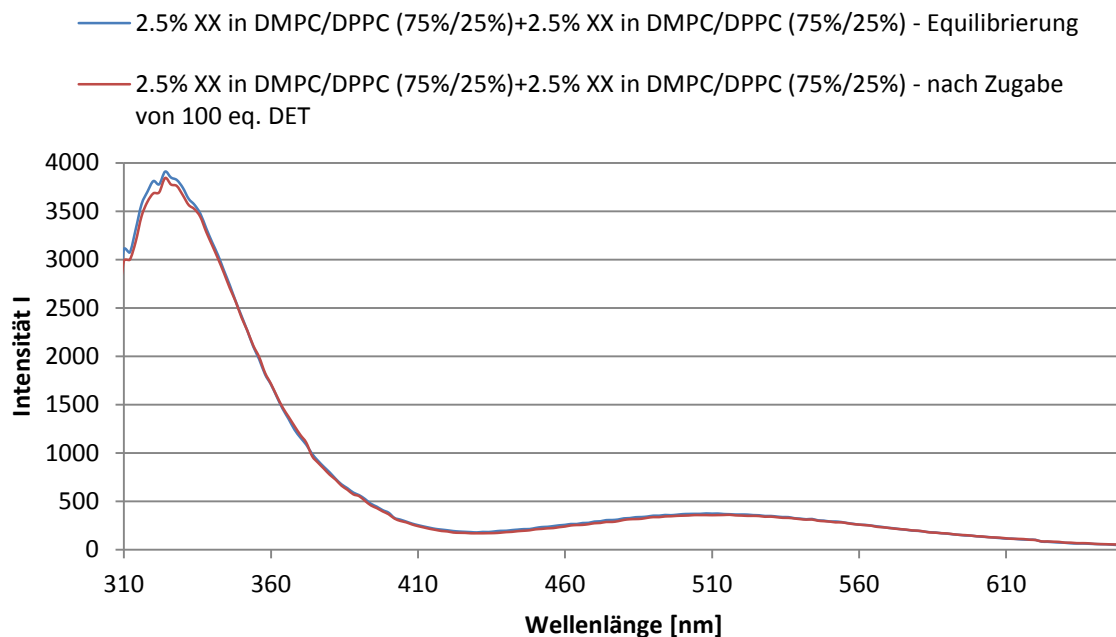


Abbildung 533: Emissionspektren von 2.5 % 66 in DMPC/DPPC (75 % - 25 %) + 2.5 % 67 in DMPC/DPPC (75 % - 25 %) vor und nach Zugabe von 100 eq. DET.

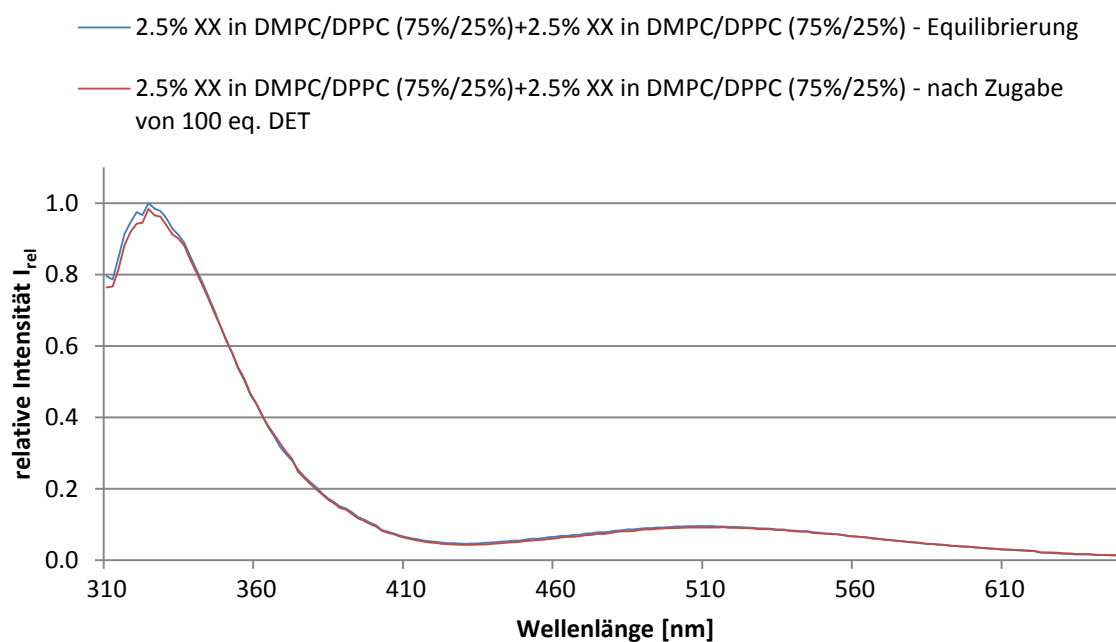


Abbildung 534: Emissionspektren von 2.5 % 66 in DMPC/DPPC (75 % - 25 %) + 2.5 % 67 in DMPC/DPPC (75 % - 25 %) vor und nach Zugabe von 100 eq. DET - relative Intensitäten I_{rel} .

Tabelle 32: Zusammenfassung der Ergebnisse.

	Vor Zugabe von 100 eq. DET			Nach Zugabe von 100 eq. DET			proz. Änderung	$\Delta\lambda_{max}$ (Em)/[nm]
	λ_{max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität	λ_{max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität		
Tryptophan	324	3911	1.00	324	3845	0.98	-2%	0
Dansyl	512	375	0.096	512	359	0.092	-0.004%	0

5.4.8 Bestimmung der Membranpermeabilität

Um zu überprüfen, ob die Signalleitung in den vorangegangenen Experimenten tatsächlich transmembraner Natur ist, oder ob der Botenstoff DET die Doppelmembran passieren kann, und somit zusätzlich eine Signalleitung auf der Membraninnenseite induziert, wurde folgendes Experiment durchgeführt: Es wurden DPPC-Liposomen in Gegenwart des Botenstoff DET trihydrochlorid präpariert, um diesen in die Vesikel zu inkludieren. Die Liposomenlösung wurde von extrazellulärem DET befreit und mit Ninhydrin versetzt, um eine eventuelle Membrangängigkeit des Botenstoffs durch sofortige Bildung eines farbigen Komplexes mittels UV-Absorption ($\lambda_{\text{Max}} = 570 \text{ nm}$) zu detektieren.

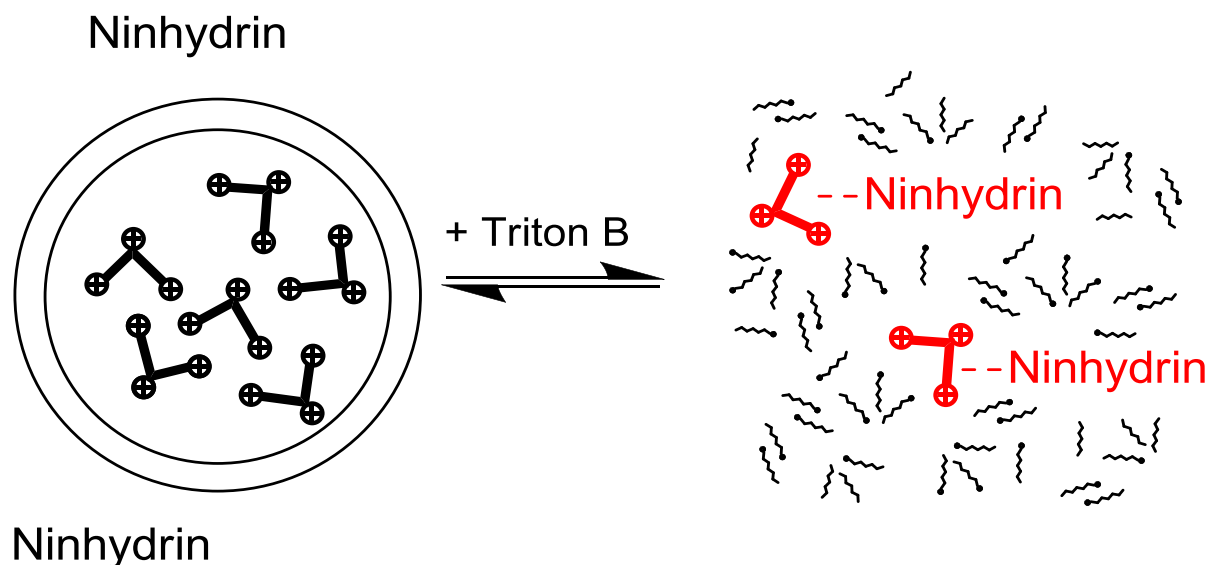


Abbildung 535: Zerstörung der liposomalen Struktur von DPPC-Liposomen durch das Detergenz Triton X.

▪ Präparation der Stammlösungen von DET trihydrochlorid und Ninhydrin

Bei einer Dotierung mit je 2.5 % der Transmembranbausteine **66** und **67** ($c = 5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, $n = 5 \times 10^{-8} \text{ mol}$) und einer Gesamtlipidkonzentration von 2 mmol/L DPPC ergibt sich für die Verwendung von 100 eq. DET trihydrochlorid als Botenstoff bezüglich der Transmembranbausteine **66** und **67** eine resultierende Konzentration von $5 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ ($n = 5 \times 10^{-6} \text{ mol}$) an DET trihydrochlorid. Diese Stoffmenge an Botenstoff soll in einem Volumen $V = 250 \mu\text{L}$ zugegeben werden. Daraus ergibt sich eine Konzentration $c(\text{DET}) = 0.02 \text{ mol/L}$. Zur Präparation einer 0.02 M Stammlösung wurden 42.51 mg (0.2 mmol) DET trihydrochlorid in 10 mL MES-Puffer ($c = 375 \text{ mM}$, $\text{pH} = 5.5$) gelöst. Um eine vollständige Umsetzung von DET zu gewährleisten, sollen zur Detektion des freien Amins 400 eq. Ninhydrin bezüglich der eingesetzten DET Menge verwendet werden. Hieraus ergibt sich eine Stoffmenge $n(\text{Ninhydrin}) = 2 \times 10^{-5} \text{ mol}$. Die Stoffmenge soll ebenfalls in einem Volumen von $V = 250 \mu\text{L}$ zugegeben werden. Daraus ergibt sich eine Konzentration $c(\text{Ninhydrin}) = 0.08 \text{ mol/L}$. Zur

Präparation einer 0.08 M Stammlösung wurden 142.5 mg (0.8 mmol) Ninhydrin in 10 mL MES-Puffer (375 mM, pH = 5.5) gelöst.

▪ Liposomenpräparation

Zur Herstellung unilamellarer Liposomen, bestehend aus einer DPPC-Lipidmatrix wurde 1 mL DPPC-Stammlösung ($c = 2 \text{ mmol/L}$) in einen 10 mL Rundkolben gegeben. Das Lösungsmittelgemisch wurde am Rotationsverdampfer bis zu Trockne eingengt und anschließend gefriergetrocknet. Hierzu wurde der Kolben 10 min in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend min. 4 h lyophilisiert. Die resultierenden Filme, bestehend aus dem Phosphatidylcholin DPPC wurde anschließend in 250 μL MES-Puffer (375 mM, pH = 5.5) aufgenommen und 250 μL DET trihydrochlorid-Stammlösung ($c = 0.02 \text{ mol/L}$) versetzt. Es wurde für min. 1 min gevortext. Anschließend wurde die trübe Suspension oberhalb der Phasenübergangstemperatur (ca. 41°C) für min. 10 min im Ultraschallbad behandelt. Die Liposomenlösung wurde mehrere Male in flüssigem Stickstoff eingefroren und langsam wieder auf RT erwärmt. Mit Hilfe des LiposoFast Basic/Stabilisator®-Systems zur Herstellung unilamellarer Liposomen wurde min. 19 mal (ungerade Extrusionzyklen) durch eine 200 nm Polycarbonatmembran extrudiert. Die so erhaltene wässrige unilamellare Liposomenlösung ($c = 4 \text{ mmol/L}$, Gesamtdotierung 5 %) wurde bis zur Reinigung bei 4°C gelagert.

▪ Reinigung unilamellarer Liposomen von nicht eingeschlossenem DET

Zur Abtrennung der hergestellten Liposomen von nicht eingeschlossenem DET, wurde die frisch präparierte Liposomenlösung über eine Sephadex G50 beschickte Säule gereinigt. Hierzu wurde eine Chromatographiesäule (12 cm Länge, 1 cm Durchmesser) abwechselnd mit MES-Puffer 1 und kleinen Portionen Sephadex G 50 befüllt und die Säule ohne Druck gepackt, bis das Gel eine Packhöhe von ca. 6 cm erreicht. Das gepackte Gel wurde mehrere Male mit dem verwendeten MES-Puffer 1 gespült. Anschließend wurden 500 μL der präparierten Liposomenlösung auf die Säule gegeben und langsam in die Säule gewaschen. Nach Auffüllen mit MES-Puffer 1 wurden Fraktionen von ca. 100 μL in Eppendorff-Gefäßen aufgefangen. Die trüben Fraktionen wurden vereinigt und die optische Dichte der Liposomenlösung bei einer Wellenlänge von 600 nm zur Konzentrationsbestimmung bestimmt. Hierzu wurde durch Vermessung von Liposomenlösungen unterschiedlicher Konzentrationen eine Kalibrierfunktion erstellt (Abbildung 536). Für die vereinigten, liposomenhaltigen Fraktionen konnte ein Gehalt an Lipidmaterial $c(\text{DPPC})$ von 4 mmol/L bestimmt werden.

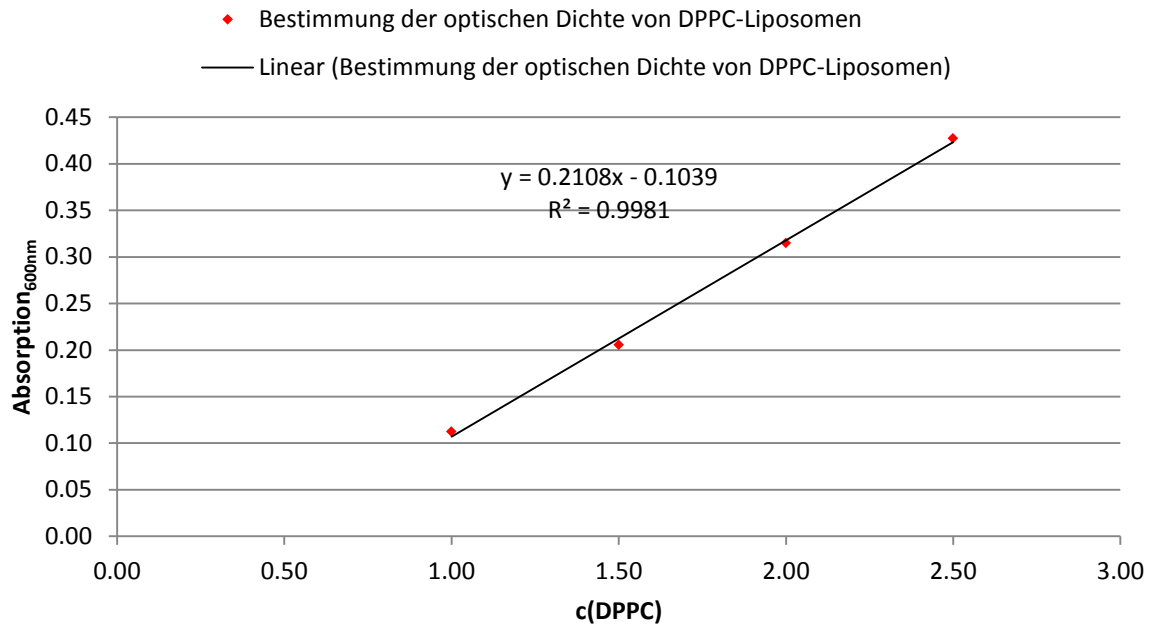


Abbildung 536: Bestimmung der optischen Dichte von DPPC-Liposomen

■ UV-VIS-Messungen

150 μ L der wässrigen Liposomenlösung wurden in eine Microtiterplatte der Marke *Falcon Flat transparent* überführt und 150 μ L Ninhydrin-Lösung ($c = 0.08$ M) zugegeben. Die Lösung wurde über einen Zeitraum von min. 35 min equilibriert und gleichzeitig auf 25 °C temperiert. Als Referenz wurde eine Basislinie (410-650 nm) gegen den verwendeten MES-Puffer **1** gemessen. Während der Equilibrierung wurde alle 5 min ein Übersichtsspektrum (410-650 nm, Bandbreite 2 nm) gemessen und die Intensitätswerte am Absorptionsmaximum des Ninhydrin-Komplexes ($\lambda = 570$ nm) bestimmt. Die Messungen wurden über einen großen Wellenlängenbereich durchgeführt um eventuell auftretende Trübungserscheinungen ausschließen zu können. Nach 35 min wurden 0.28 mol% Triton X als Detergenz zugegeben, um die Liposomen zu zerstören. Für weitere 35 min wurde alle 5 min ein Übersichtsspektrum (410-650 nm, Bandbreite 2 nm) gemessen und die Intensitätswerte am Absorptionsmaximum des Ninhydrin-Komplexes ($\lambda = 570$ nm) bestimmt.

■ Referenzmessungen

Um störende Effekte im vorliegenden Experiment ausschließen zu können, wurden im Folgenden zwei Referenzexperimente durchgeführt. Zum einen wurden sowohl der Botenstoff DET, als auch das Ninhydrin zu einer bestehenden Liposomenlösungen gegeben, um eine Referenzmessung für die Ausbildung des DET-Ninhydrin-Komplexes zu haben (a), zum anderen wurde Ninhydrin unter Abwesenheit des Botenstoffs zu einer bestehenden Liposo-

menlösung gegeben, um unerwünschte Nebenreaktionen des Ninhydrin-Farbstoffs mit dem Lipidmaterial DPPC ausschließen zu können (b).

a) Die Präparation einer unilamellaren DPPC-Liposomen-Lösung erfolgte entsprechend Vorschrift 5.4. Die Rehydratisierung erfolgte in 500 μL MES-Puffer (375 mM, pH = 5.5). Zu der so präparierten Liposomen-Lösung wurden 250 μL DET trihydrochlorid-Stammlösung ($c = 0.02 \text{ M}$, 375 mM MES-Puffer, pH = 5.5) und 250 μL Ninhydrin-Stammlösung ($c = 0.08 \text{ M}$, 375 mM MES-Puffer, pH = 5.5) gegeben. Somit ergibt sich eine Endkonzentration der Liposomenlösung von 2 mmol/L DPPC, $5 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ DET (extern) und $2 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ Ninhydrin (extern) in 375 mM MES-Puffer (pH = 5.5).

300 μL der Liposomenlösung wurden in eine Microtiterplatte der Marke *Falcon Flat transparent* überführt. Die Lösung wurde über einen Zeitraum von 36 min bei 25 °C inkubiert und alle 3 min ein Übersichtspektrum gemessen (410 – 650 nm, Bandbreite 2 nm) und die Intensitätswerte am Absorptionmaximum des farbigen DET-Ninhydrin-Komplexes bestimmt ($\lambda = 570 \text{ nm}$). Die Messungen wurden über einen großen Wellenlängenbereich durchgeführt, um eventuell auftretende Trübungserscheinungen ausschließen zu können. Als Referenz wurde eine Basislinie gegen den verwendeten MES-Puffer **1** gemessen.

b) Die Präparation einer unilamellaren DPPC-Liposomen-Lösung erfolgte entsprechend Vorschrift 5.4. Die Rehydratisierung erfolgte in 750 μL MES-Puffer (375 mM, pH = 5.5). Zu der so präparierten Liposomen-Lösung wurden 250 μL Ninhydrin-Stammlösung ($c = 0.08 \text{ M}$, 375 mM MES-Puffer, pH = 5.5) gegeben. Somit ergibt sich eine Endkonzentration der Liposomenlösung von 2 mmol/L DPPC und $2 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ Ninhydrin (extern) in 375 mM MES-Puffer (pH = 5.5).

300 μL der Liposomenlösung wurden in eine Microtiterplatte der Marke *Falcon Flat transparent* überführt. Die Lösung wurde über einen Zeitraum von 36 min bei 25 °C inkubiert und alle 3 min ein Übersichtspektrum gemessen (410 – 650 nm, Bandbreite 2 nm) und die Intensitätswerte am Absorptionmaximum des farbigen DET-Ninhydrin-Komplexes bestimmt ($\lambda = 570 \text{ nm}$). Die Messungen wurden über einen großen Wellenlängenbereich durchgeführt, um eventuell auftretende Trübungserscheinungen ausschließen zu können. Als Referenz wurde eine Basislinie gegen den verwendeten MES-Puffer **1** gemessen.

Bestimmung der Membranpermeabilität:

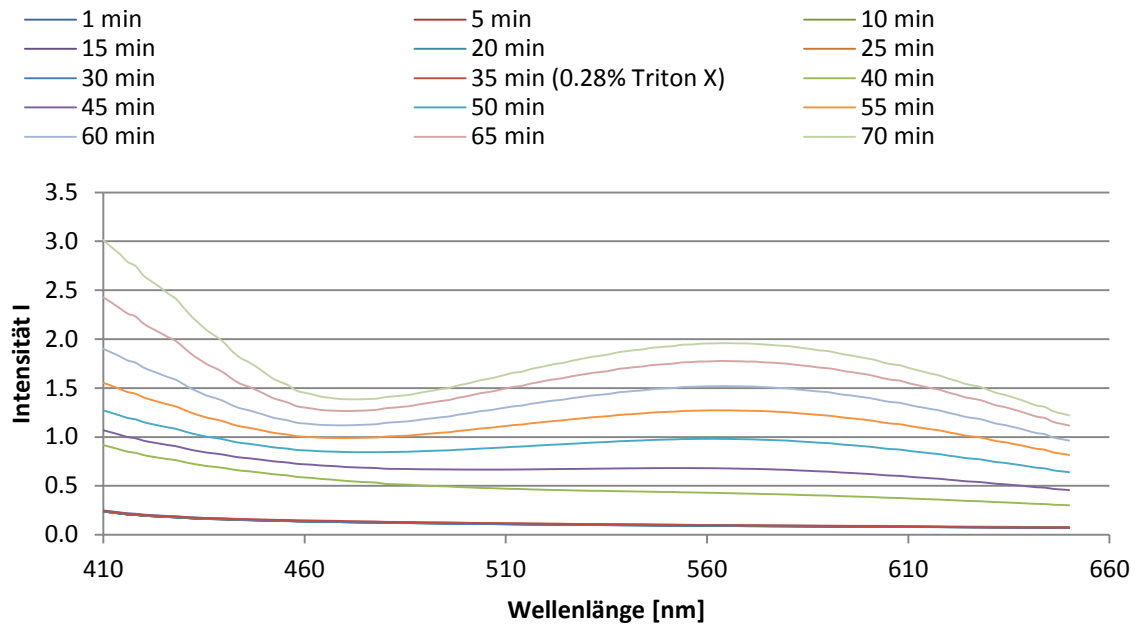


Abbildung 537: 2 mmol/L DPPC + 100 eq. DET (intern) + 400 eq. Ninhydrin (extern).

Referenzmessung a):

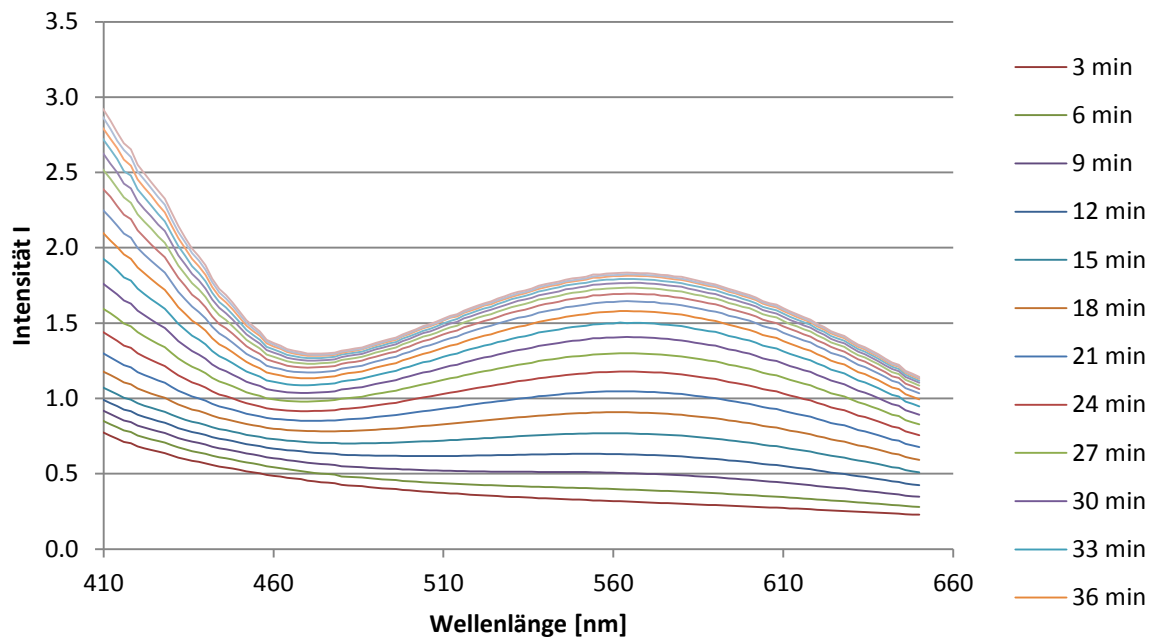
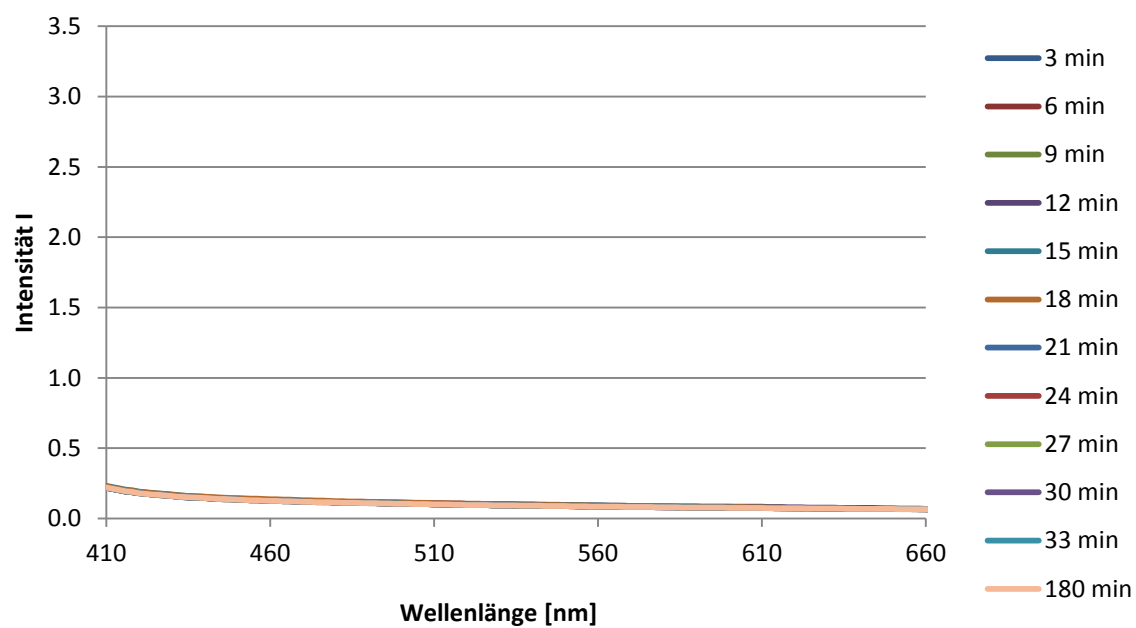


Abbildung 538: 2 mmol/L DPPC + 100 eq. DET (extern) + 400 eq. Ninhydrin (extern).

Referenzmessung b):Abbildung 539: 2 mmol/L DPPC + 400 eq. Ninhydrin (extern).

5.5 Signaltransduktionsexperimente mit den Rezeptoren 67 und 121

■ UV-Vis- und Fluoreszenzspektren des Rezeptors 121 in Lösung

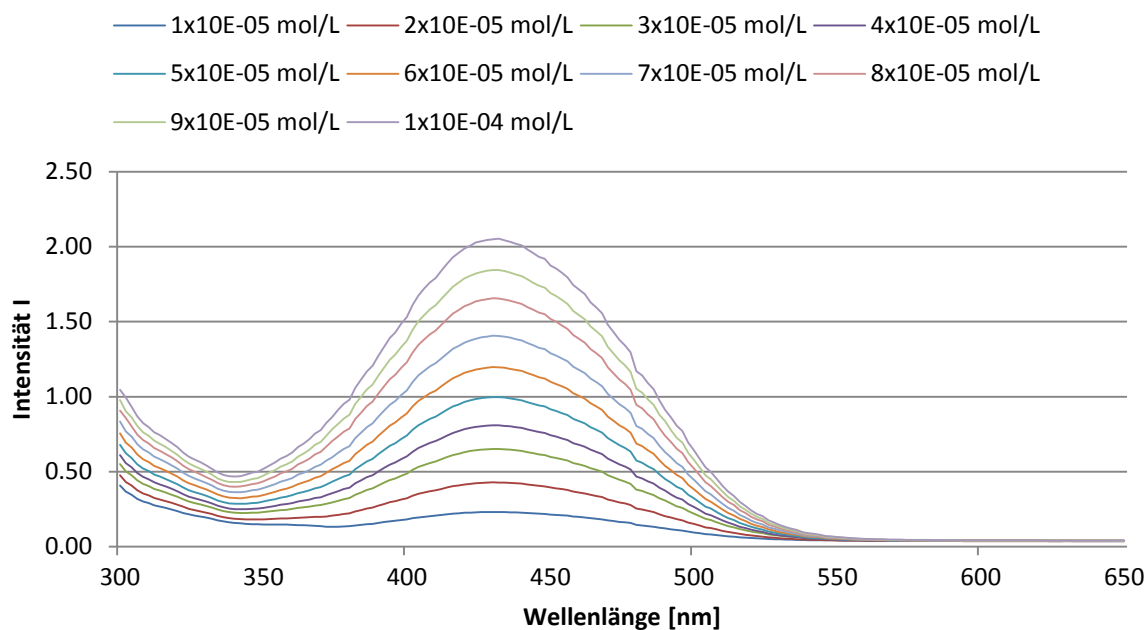


Abbildung 540: Absorptionsspektren von 121 ($c = 10^{-5}$ mol/L - 10^{-4} mol/L) in MeOH.

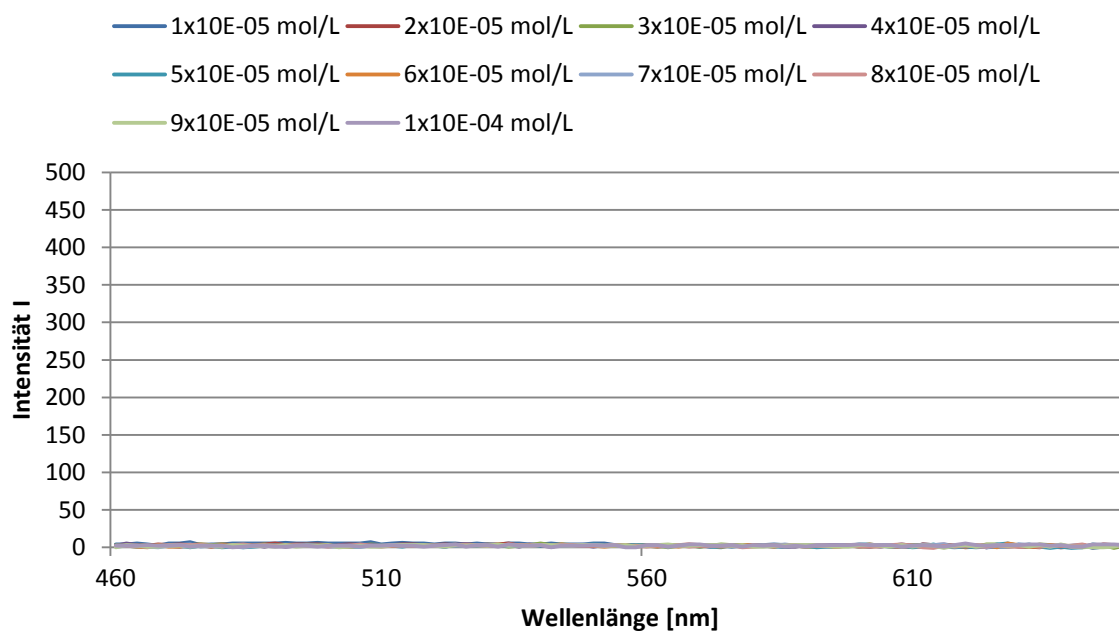


Abbildung 541: Emissionsspektren von 121 ($c = 10^{-5}$ mol/L - 10^{-4} mol/L) in MeOH ($\lambda_{\text{ex}} = 435$ nm).

5.5.1 Signaltransduktionsexperimente mit DMPC/DPPC-Liposomen

▪ Präparation der Stammlösungen von **67** und **121**

Zur Präparation 10^{-4} molarer Stammlösungen der Transmembranbausteine **67** und **121** wurden 17.9 mg (1.171×10^{-5} mol) **67** in 1.171 mL $\text{CH}_3\text{Cl}/\text{MeOH} = 9:1$ und 8.7 mg (5.825×10^{-6} mol) **121** in 582.5 μL $\text{CH}_3\text{Cl}/\text{MeOH} = 9:1$ gelöst. Aus diesen je 10^{-2} molaren Lösungen wurden über eine Verdünnungsreihe die 10^{-4} molaren Stammlösungen erhalten (Lösungsmittel: Chloroform/MeOH = 9:1). Die Stammlösungen wurden bei -18°C gelagert.

▪ Liposomenpräparation und Fluoreszenzmessungen

Für die folgenden Experimente wurden Liposomen mit einer Dotierung von 2.0 %, 2.5 % und 3.0 % der Transmembranbausteine **67** und **121** in einer Lipidmatrix aus DMPC/DPPC = 75 % - 25 % verwendet. Entsprechend der Tabelle 3 und Tabelle 4 wurden je 400 μL , 500 μL und 600 μL der Transmembranbausteinlösungen ($c = 10^{-4}$ mol/L) **67** und **121** mit 750 μL der DMPC-Stammlösung ($c = 2$ mmol/L) und 250 μL DPPC-Stammlösung ($c = 2$ mmol/L) versetzt. Die Gemische wurden am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt und anschließend für min. 3 h gefriergetrocknet. Die resultierenden Filme wurden in 1 mL MES-Puffer (375 mmol, pH = 5.5) aufgenommen und für min. 1 min gevortext. Anschließend wurde die Liposomenlösung zur Herstellung unilamellarer Liposomen min. 19 (ungerade Anzahl an Extrusionszyklen) mal durch eine 200 nm Polycarbonatmembran extrudiert (Details: siehe 5.4).

300 μL der wässrigen Liposomenlösung wurden in eine Microtiterplatte der Marke *Falcon Black Flat* überführt und die Lösung über einen Zeitraum von min. 40 min equilibriert und gleichzeitig auf 25°C temperiert. Als Referenz wurde eine Basislinie (400-650 nm) gegen den verwendeten MES-Puffer **1** gemessen. Während der Equilibrierung wurde alle 90 sec ein Übersichtsspektrum (400-650 nm, Bandbreite 2 nm) gemessen und die Intensitätswerte der Emissionsmaxima des FRET-Donors **67** bestimmt ($\lambda_{\text{Ex}} = 330$ nm). Nach annähernder Konstanz der Intensitätsmaxima wurden 100 eq. Ethylendiamin (EDA) (**113**), 100 eq. Diethylentriamin trihydrochlorid (DET) bzw. Triethylentetramin (TREN) (**114**) zugegeben. Wiederum wurde über einen Zeitraum von min. 40 min alle 90 s ein Übersichtsspektrum gemessen und die Intensitäten des Emissionsmaximums bestimmt. Die Messungen wurden über einen großen Wellenlängenbereich durchgeführt um eventuell auftretende Trübungserscheinungen ausschließen zu können.

- **Dotierung mit je 2.0 % der Rezeptoren 67 und 121 und EDA (113) als Botenstoff**

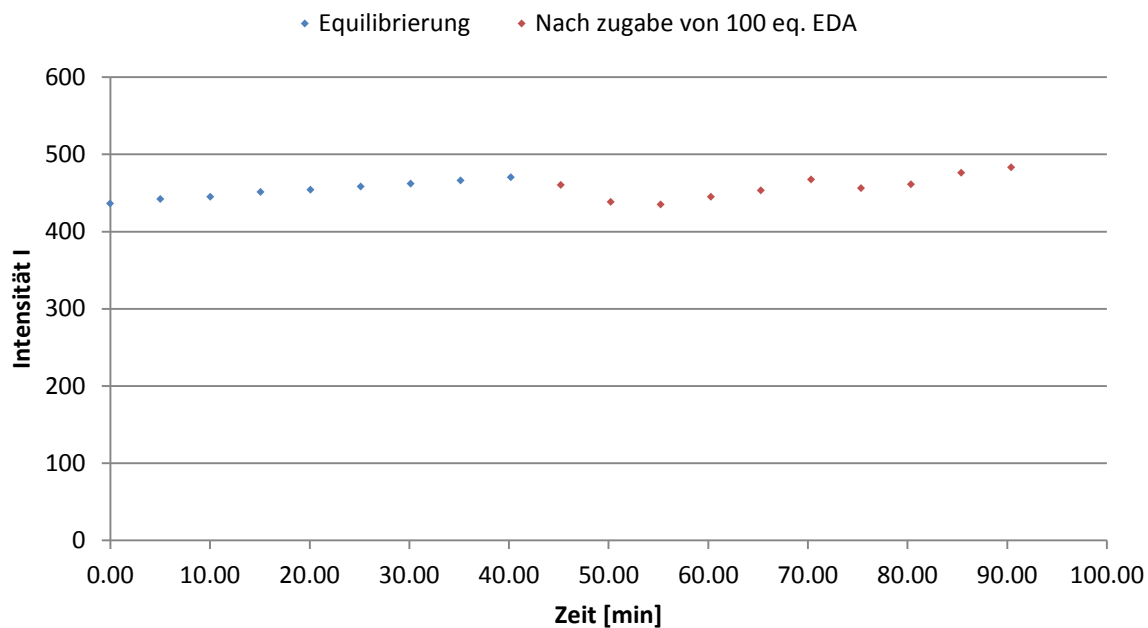


Abbildung 542: Zeitliche Änderung der Fluoreszenzintensität I vor und nach Zugabe von 100 eq. EDA (113) (4 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %).

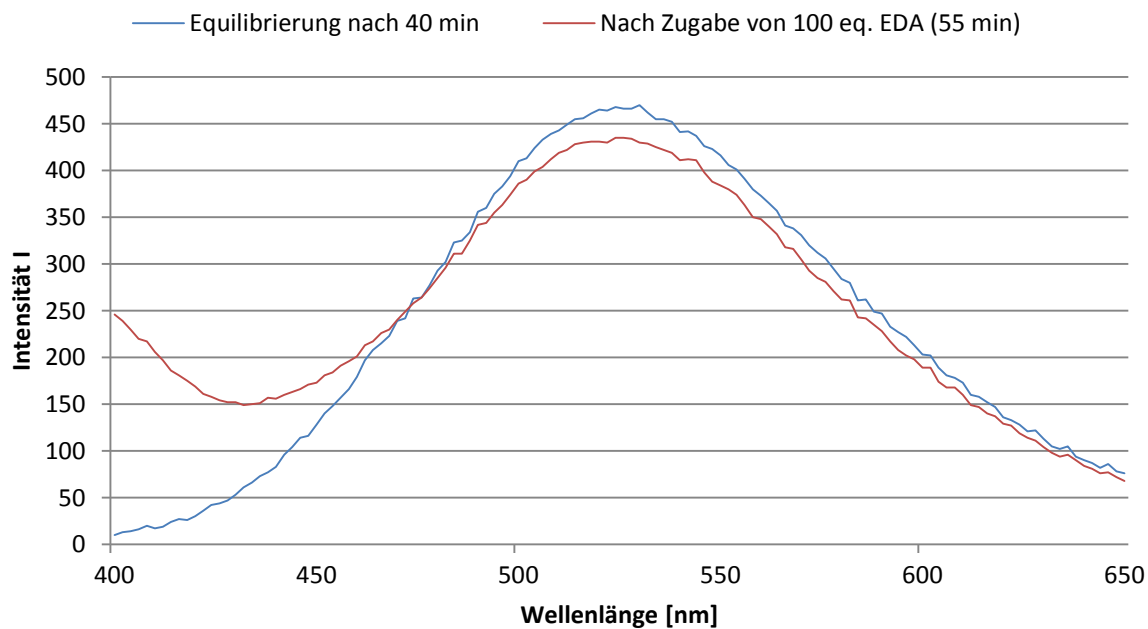


Abbildung 543: Emissionsspektren vor und nach Zugabe von 100 eq. EDA (113) (4 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %).

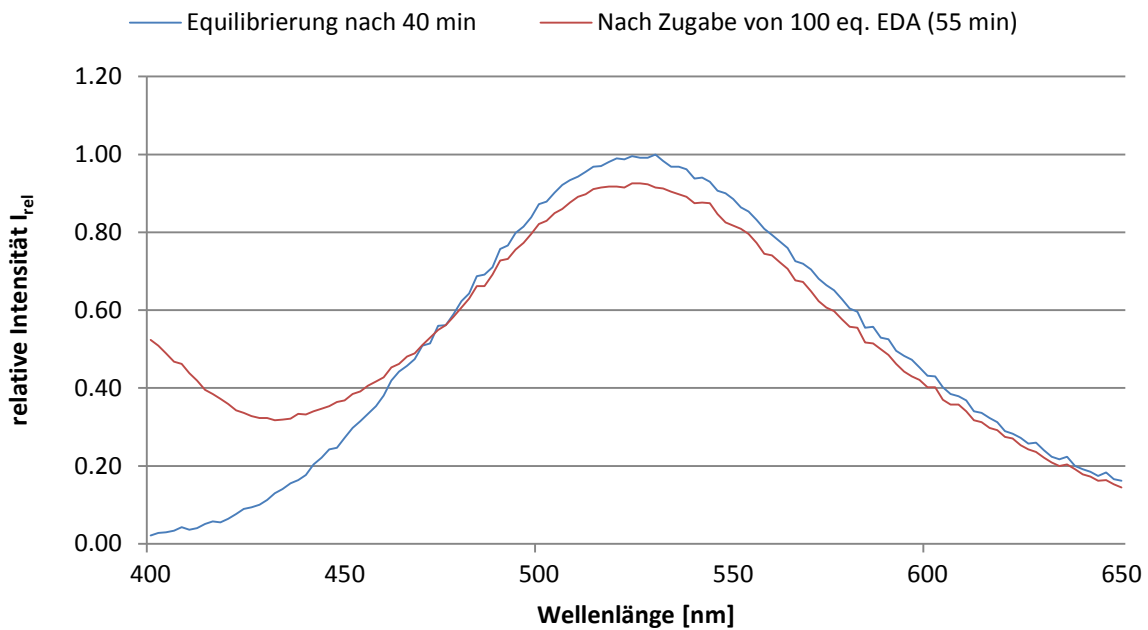


Abbildung 544: Änderung der relativen Intensitäten I_{rel} nach Zugabe von 100 eq. EDA (113) (4 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %).

- **Dotierung mit je 2.0 % der Rezeptoren 67 und 121 und DET als Botenstoff**

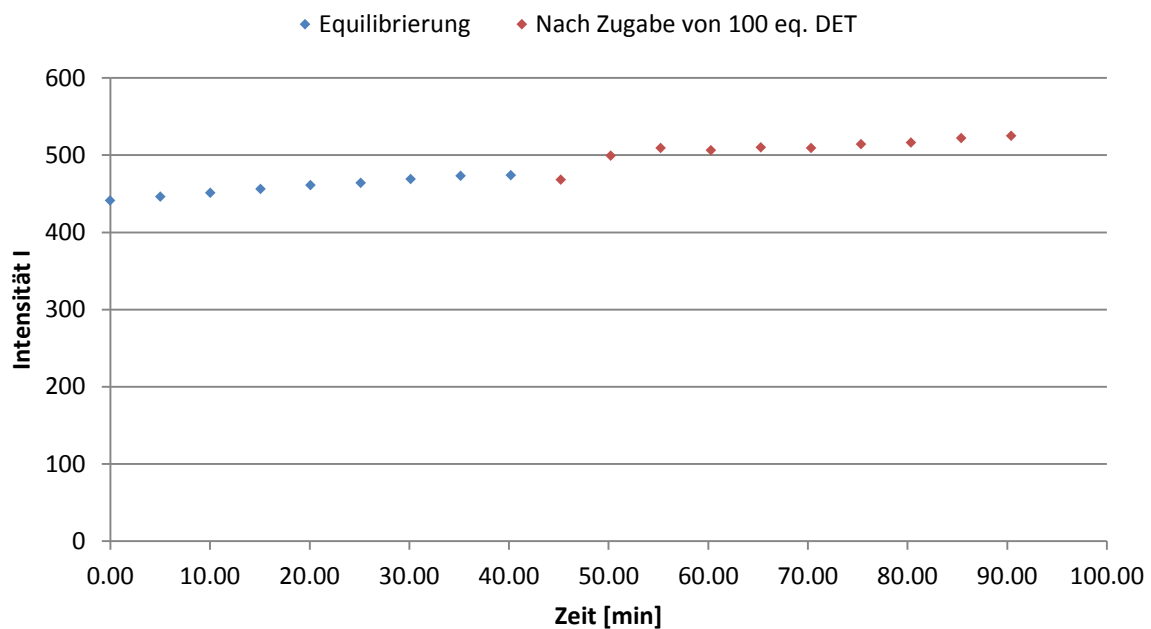


Abbildung 545: Zeitliche Änderung der Fluoreszenzintensität I vor und nach Zugabe von 100 eq. DET (4 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %).

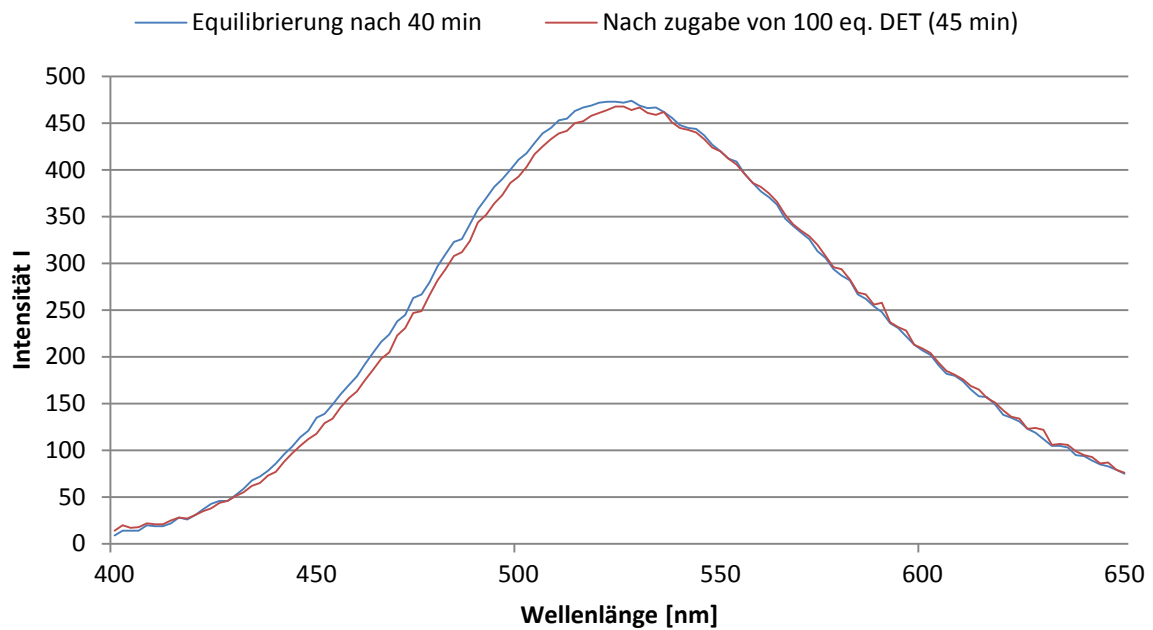


Abbildung 546: Emissionsspektren vor und nach Zugabe von 100 eq. DET (4 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %).

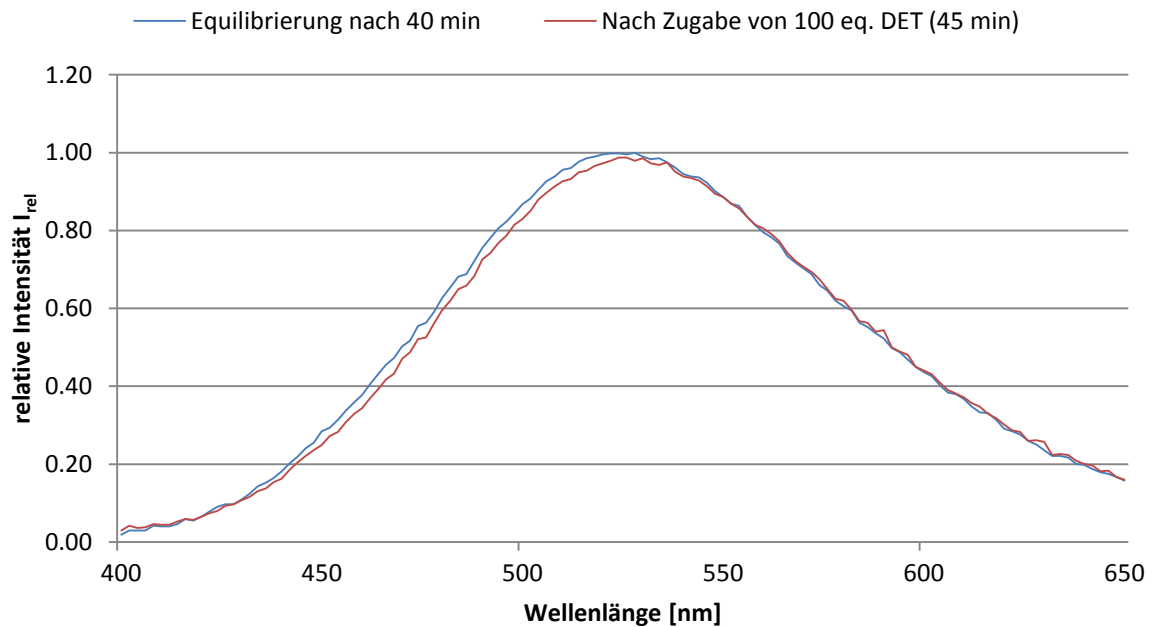


Abbildung 547: Änderung der relativen Intensitäten I_{rel} nach Zugabe von 100 eq. DET (4 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %).

- **Dotierung mit je 2.0 % der Rezeptoren 67 und 121 und TREN (114) als Botenstoff**

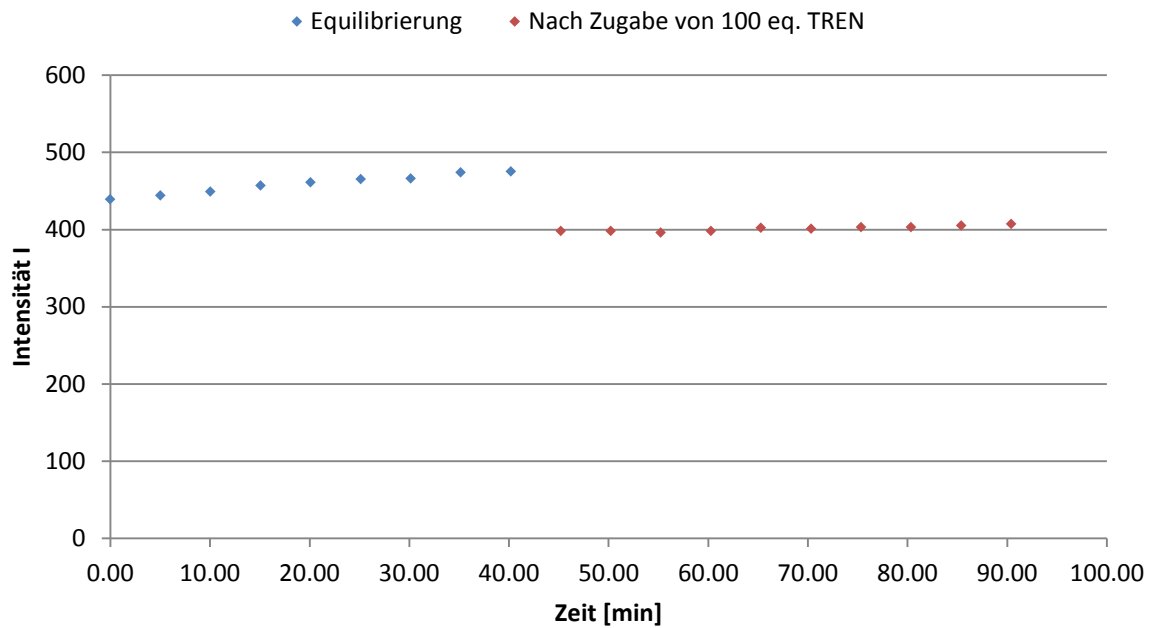


Abbildung 548: Zeitliche Änderung der Fluoreszenzintensität I vor und nach Zugabe von 100 eq. TREN (114) (4 % in DMPC/DPPC = 75 %/25 %).

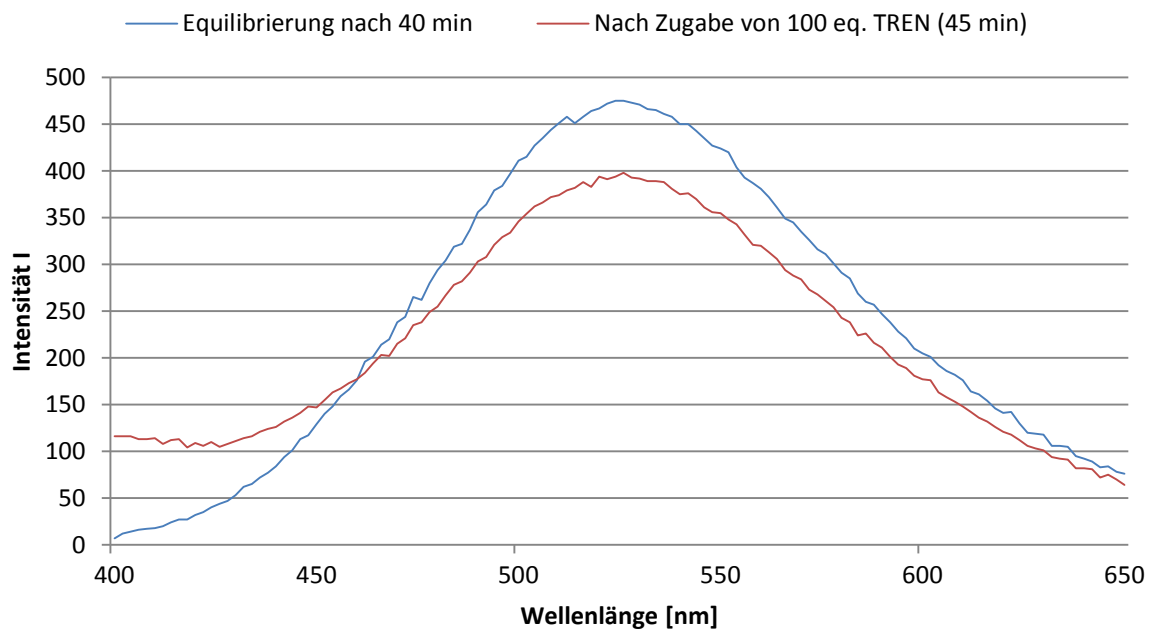


Abbildung 549: Emissionsspektren vor und nach Zugabe von 100 eq. TREN (114) (4 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %).

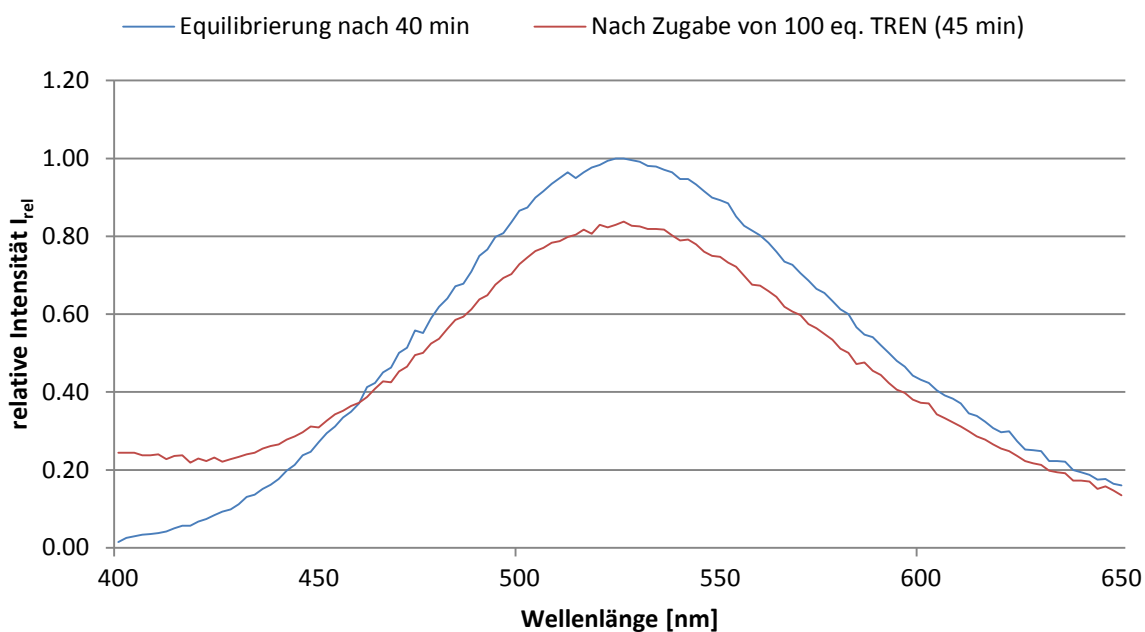


Abbildung 550: Änderung der relativen Intensitäten I_{rel} nach Zugabe von 100 eq. TREN (114) (4 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %).

Tabelle 33: Zusammenfassung der Ergebnisse mit je 2 % Dotierung der Transmembranbausteine 67 und 121.

	Vor Zugabe von 100 eq. EDA			Nach Zugabe von 100 eq. EDA			proz. Änderung	$\Delta\lambda_{max}$ (Em)/[nm]
	λ_{max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität	λ_{max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität		
Dansyl	530	470	1.0	524	430	0.93	-7%	-6
	Vor Zugabe von 100 eq. DET			Nach Zugabe von 100 eq. DET			proz. Änderung	$\Delta\lambda_{max}$ (Em)/[nm]
	λ_{max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität	λ_{max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität		
Dansyl	528	474	1.0	524	468	0.99	-1%	-4
	Vor Zugabe von 100 eq. TREN			Nach Zugabe von 100 eq. TREN			proz. Änderung	$\Delta\lambda_{max}$ (Em)/[nm]
	λ_{max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität	λ_{max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität		
Dansyl	526	475	1.0	526	398	0.84	-16%	0

- **Dotierung mit je 2.5 % der Rezeptoren 67 und 121 und EDA (113) als Botenstoff**

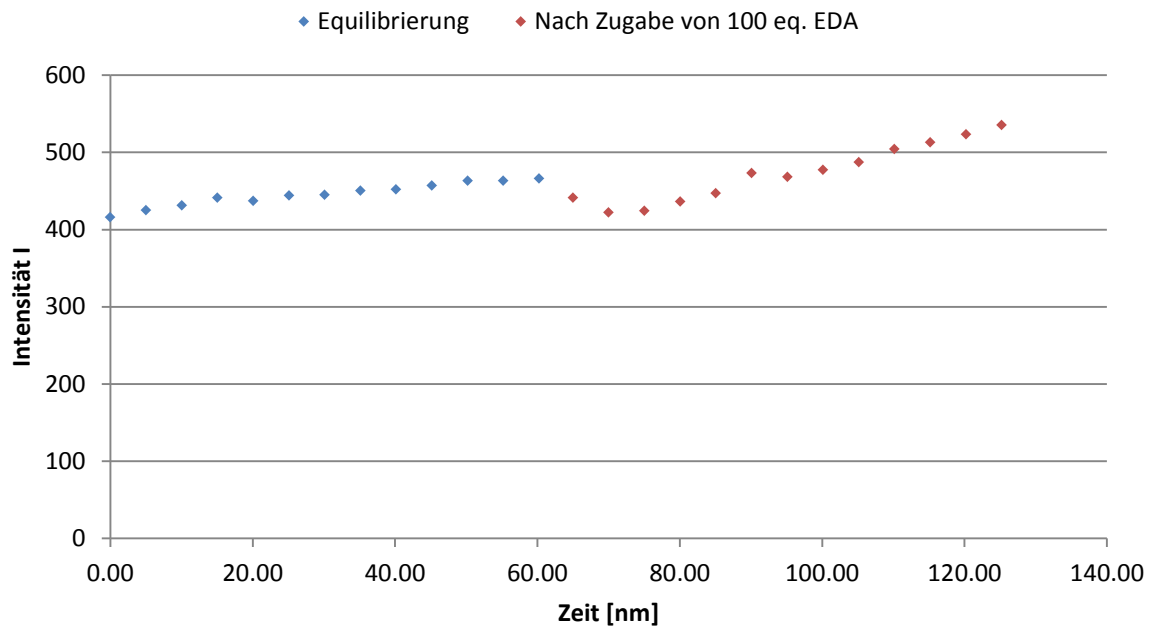


Abbildung 551: Zeitliche Änderung der Fluoreszenzintensität I vor und nach Zugabe von 100 eq. EDA (113) (5 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %).

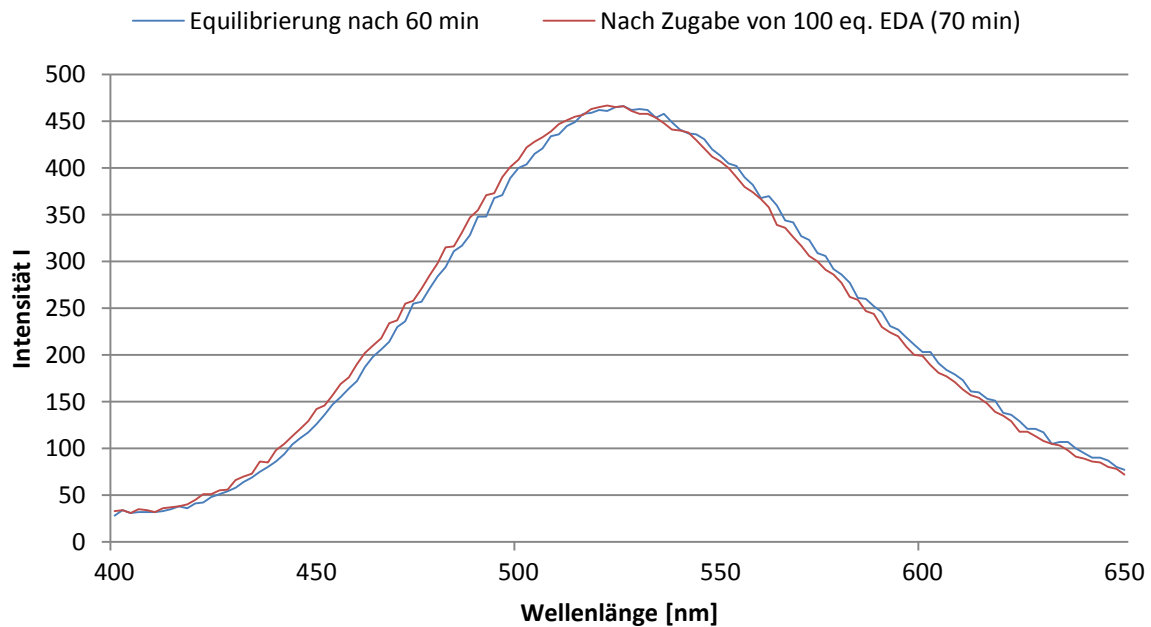


Abbildung 552: Emissionsspektren vor und nach Zugabe von 100 eq. EDA (113) (5 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %).

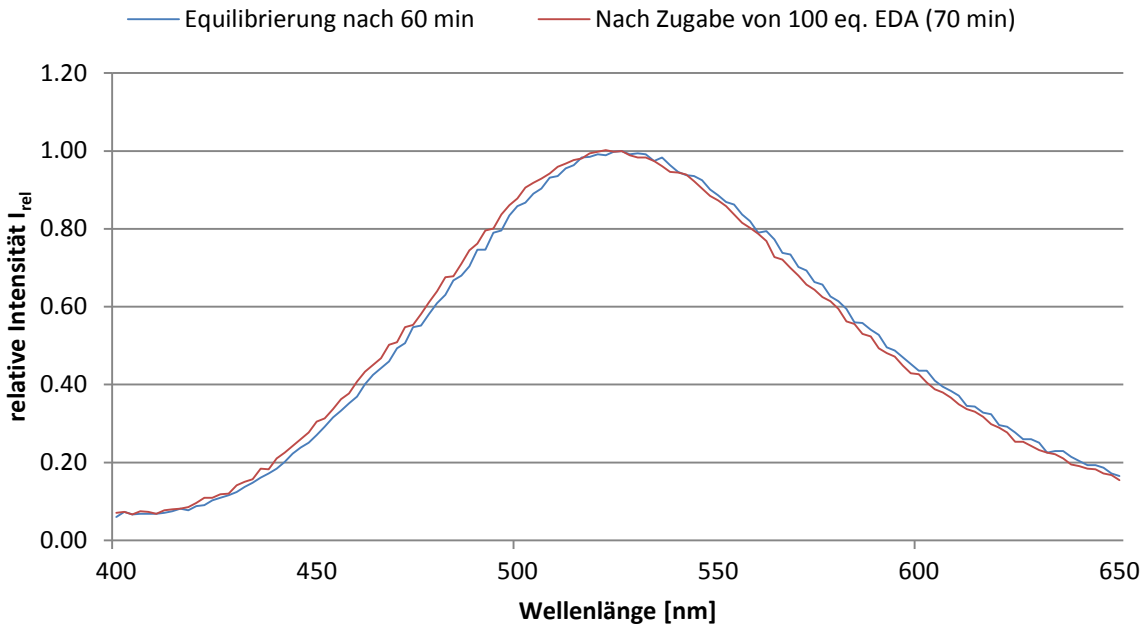


Abbildung 553: Änderung der relativen Intensitäten I_{rel} nach Zugabe von 100 eq. EDA (113) (5 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %).

- **Dotierung mit je 2.5 % der Rezeptoren 67 und 121 und DET als Botenstoff**

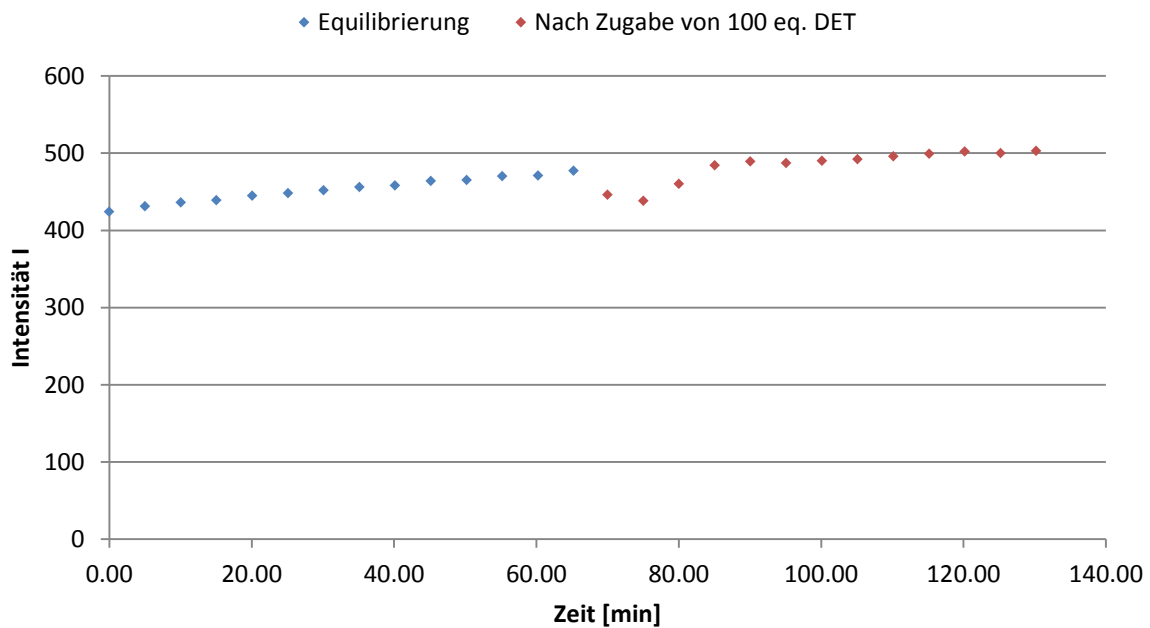


Abbildung 554: Zeitliche Änderung der Fluoreszenzintensität I vor und nach Zugabe von 100 eq. DET (5 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %).

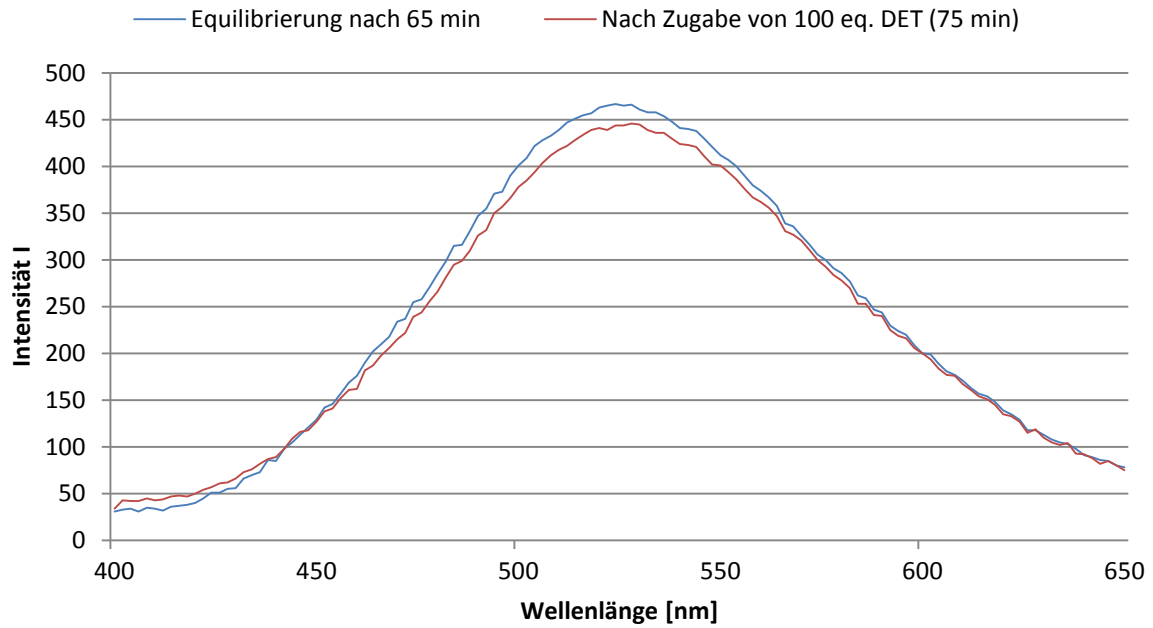


Abbildung 555: Emissionsspektren vor und nach Zugabe von 100 eq. DET (5 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %).

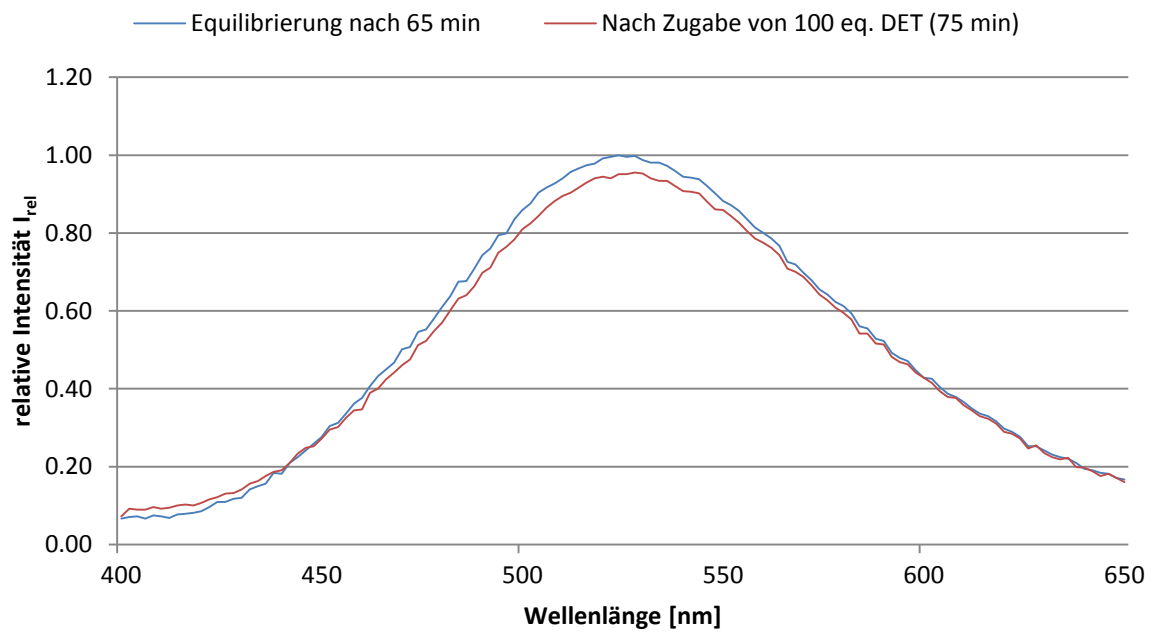


Abbildung 556: Änderung der relativen Intensitäten I_{rel} nach Zugabe von 100 eq. DET (5 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %).

- Dotierung mit je 2.5 % der Rezeptoren 67 und 121 und TREN (114) als Botenstoff

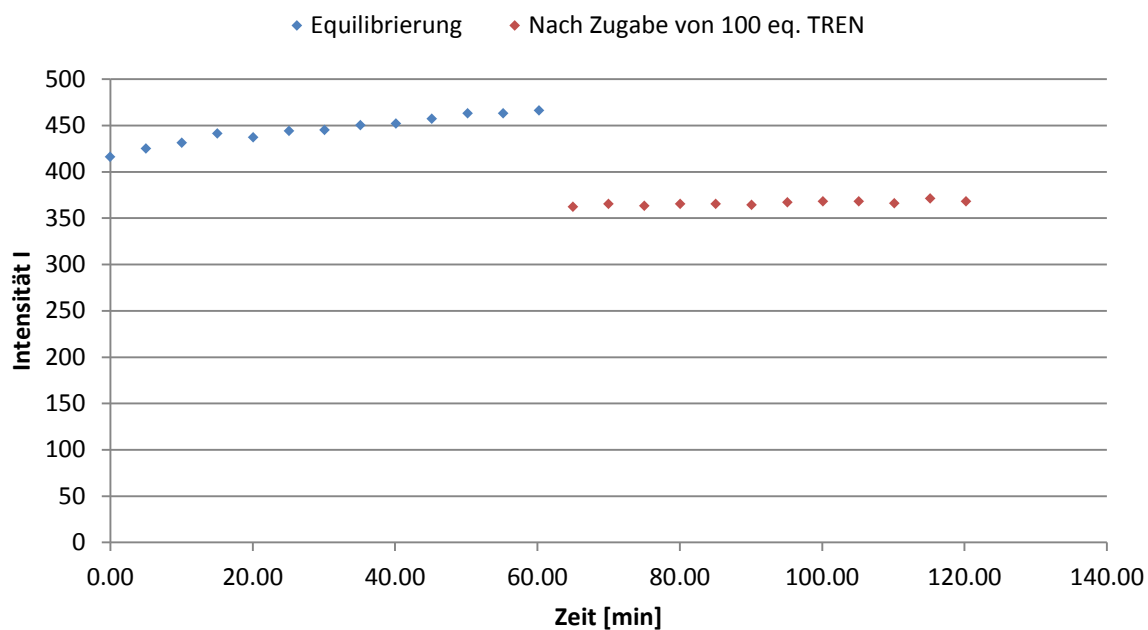


Abbildung 557: Zeitliche Änderung der Fluoreszenzintensität I vor und nach Zugabe von 100 eq. TREN (114) (5 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %).

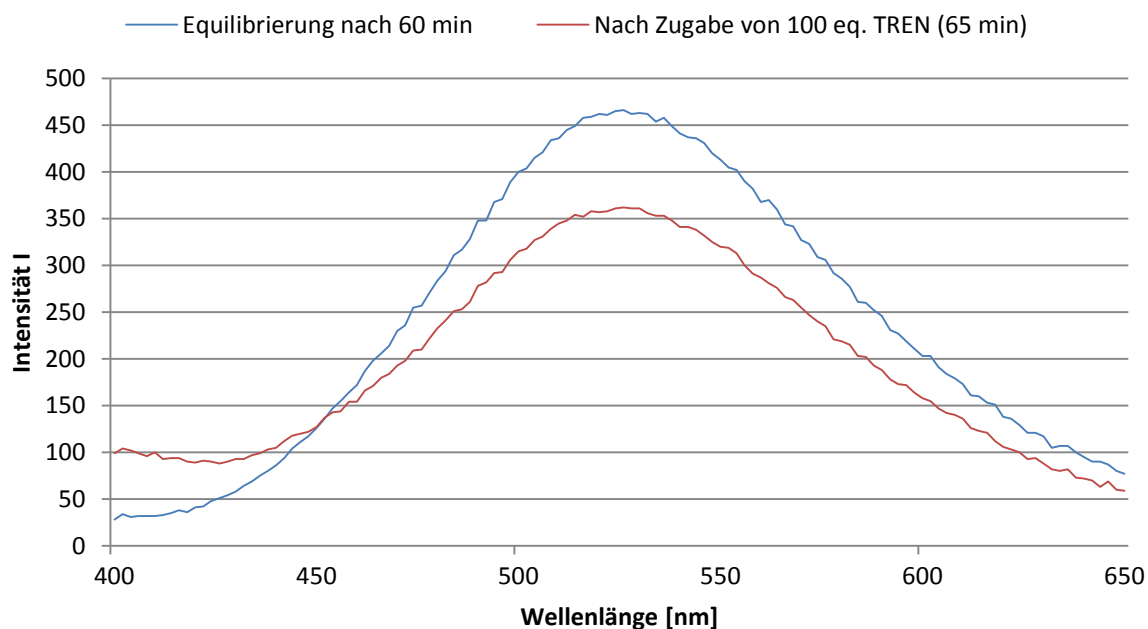


Abbildung 558: Emissionsspektren vor und nach Zugabe von 100 eq. TREN (114) (5 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %).

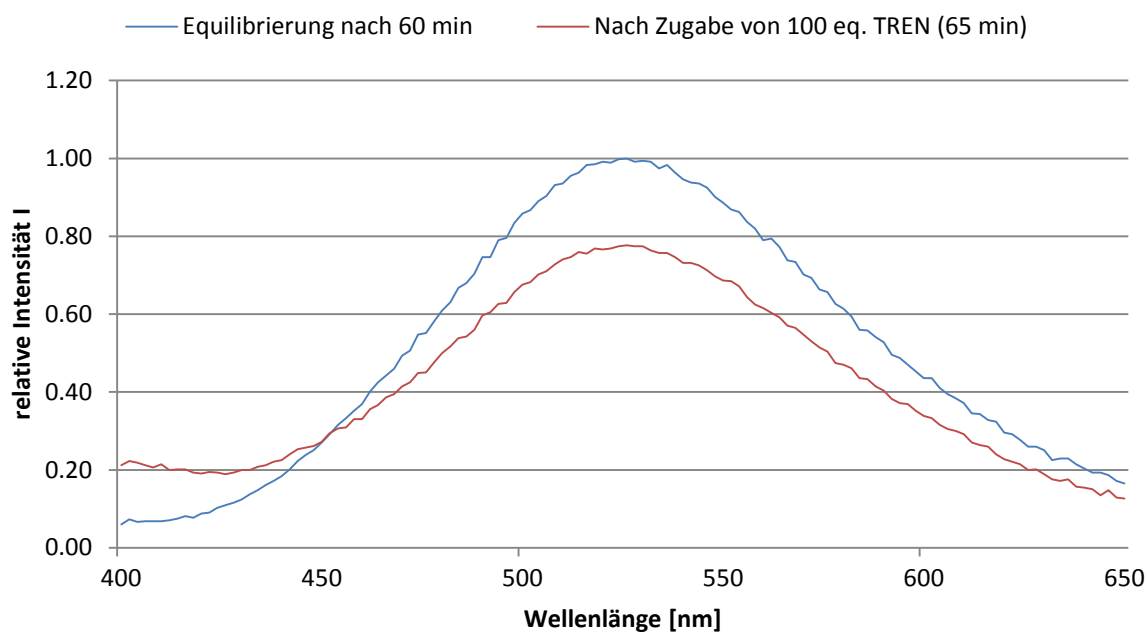


Abbildung 559: Änderung der relativen Intensitäten I_{rel} nach Zugabe von 100 eq. TREN (114) (5 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %).

Tabelle 34: Zusammenfassung der Ergebnisse mit je 2.5 % Dotierung der Transmembranbausteine 67 und 121.

	Vor Zugabe von 100 eq. EDA			Nach Zugabe von 100 eq. EDA				
	λ_{max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität	λ_{max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität	proz. Änderung	$\Delta\lambda_{\text{max}}$ (Em)/[nm]
Dansyl	526	466	1.0	526	466	1.0	0%	0
	Vor Zugabe von 100 eq. DET			Nach Zugabe von 100 eq. DET				
	λ_{max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität	λ_{max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität	proz. Änderung	$\Delta\lambda_{\text{max}}$ (Em)/[nm]
Dansyl	524	467	1.0	524	444	0.95	-5%	0
	Vor Zugabe von 100 eq. TREN			Nach Zugabe von 100 eq. TREN				
	λ_{max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität	λ_{max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität	proz. Änderung	$\Delta\lambda_{\text{max}}$ (Em)/[nm]
Dansyl	526	466	1.0	526	362	0.78	-22%	0

- **Dotierung mit je 3.0 % der Rezeptoren 67 und 121 und EDA (113) als Botenstoff**

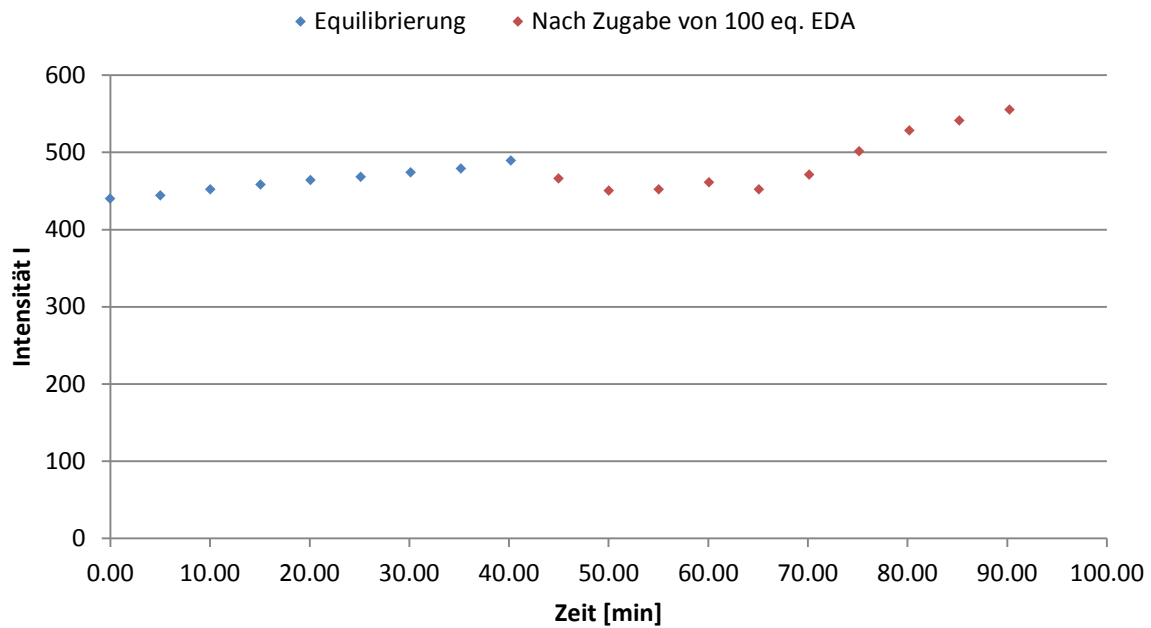


Abbildung 560: Zeitliche Änderung der Fluoreszenzintensität I vor und nach Zugabe von 100 eq. EDA (113) (6 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %).

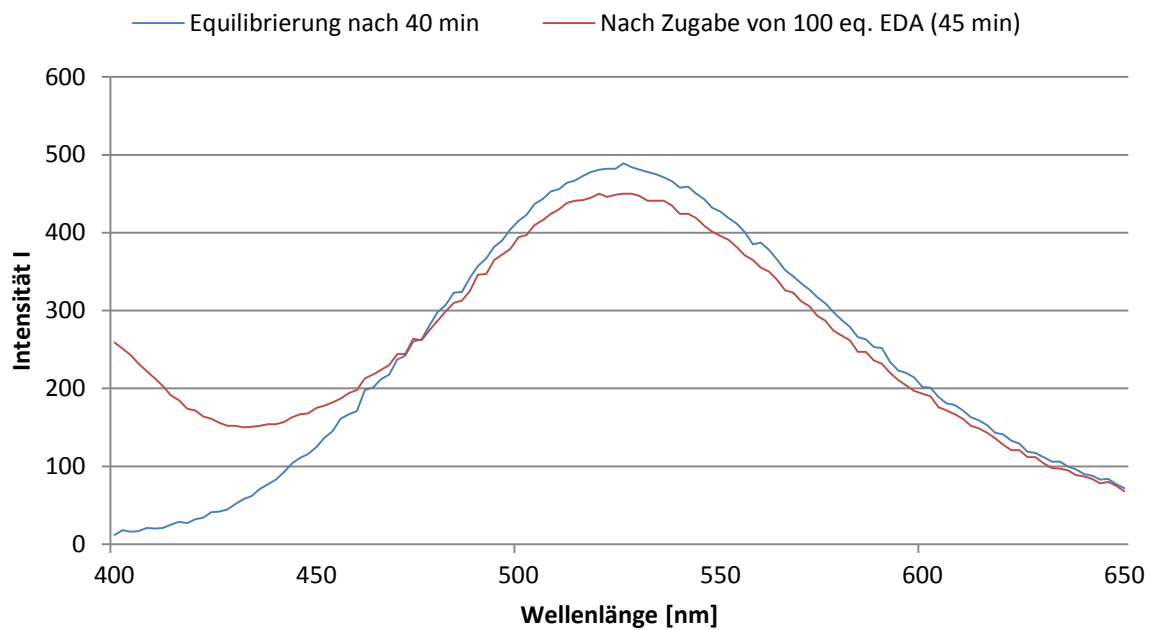


Abbildung 561: Emissionsspektren vor und nach Zugabe von 100 eq. EDA (113) (6 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %).

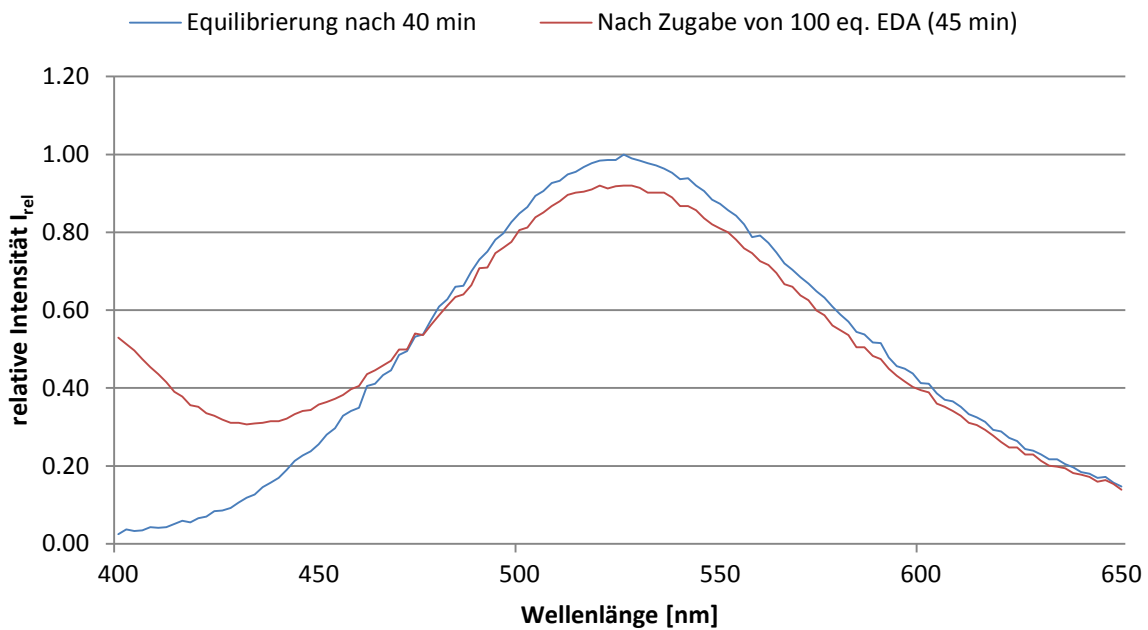


Abbildung 562: Änderung der relativen Intensitäten I_{rel} nach Zugabe von 100 eq. EDA (113) (6 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %).

- **Dotierung mit je 3.0 % der Rezeptoren 67 und 121 und DET als Botenstoff**

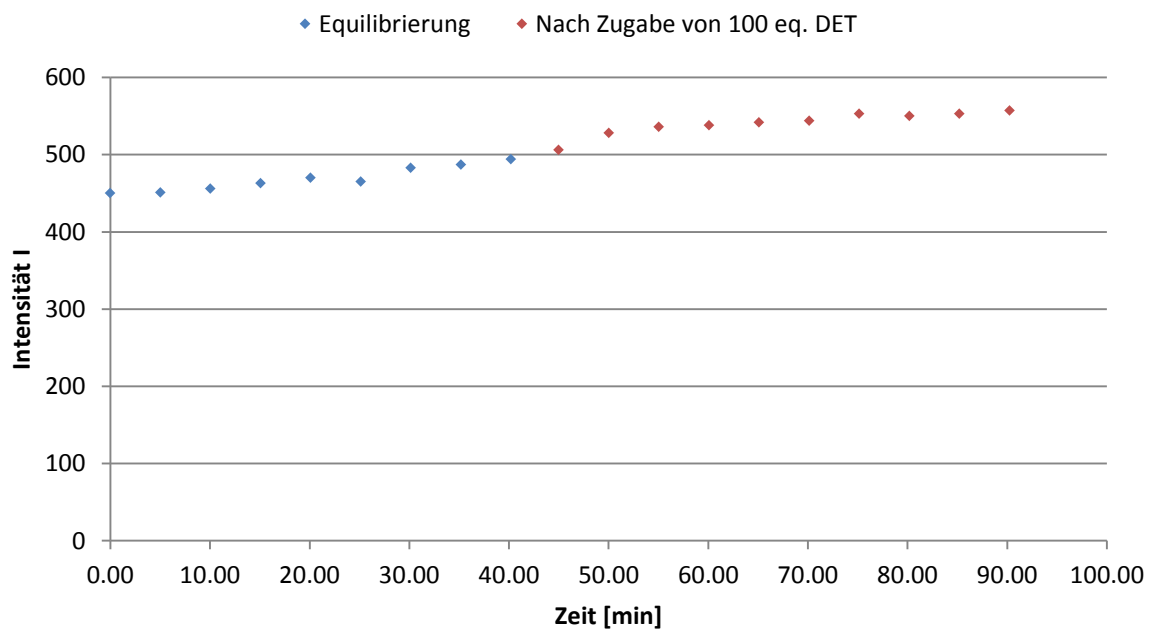


Abbildung 563: Zeitliche Änderung der Fluoreszenzintensität I vor und nach Zugabe von 100 eq. DET (6 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %).

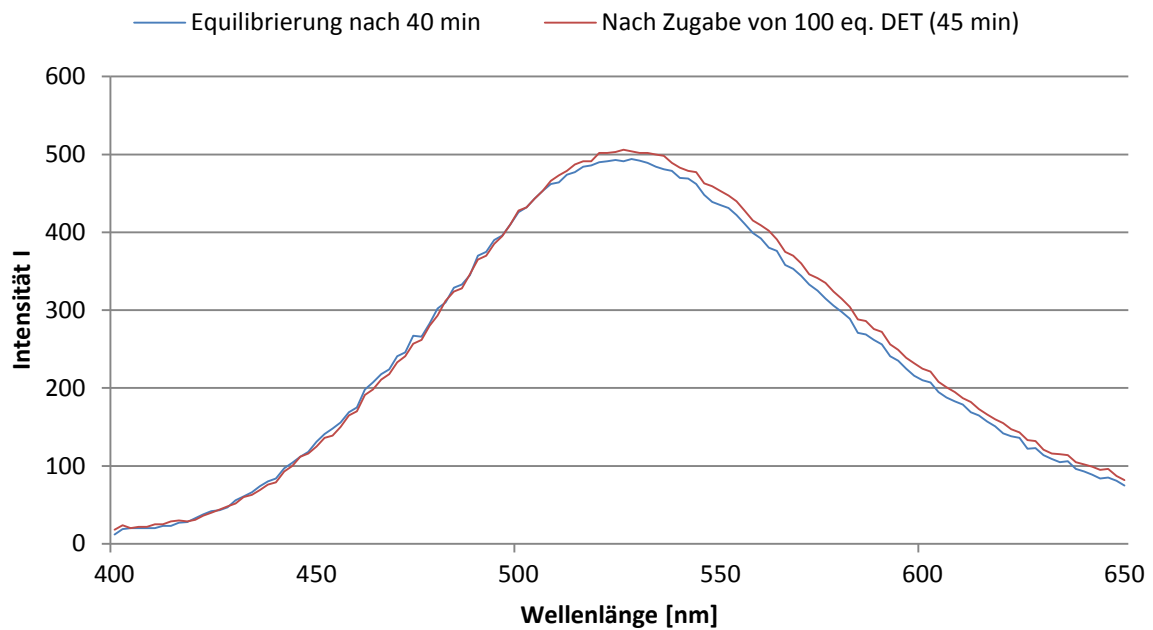


Abbildung 564: Emissionsspektren vor und nach Zugabe von 100 eq. DET (6 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %).

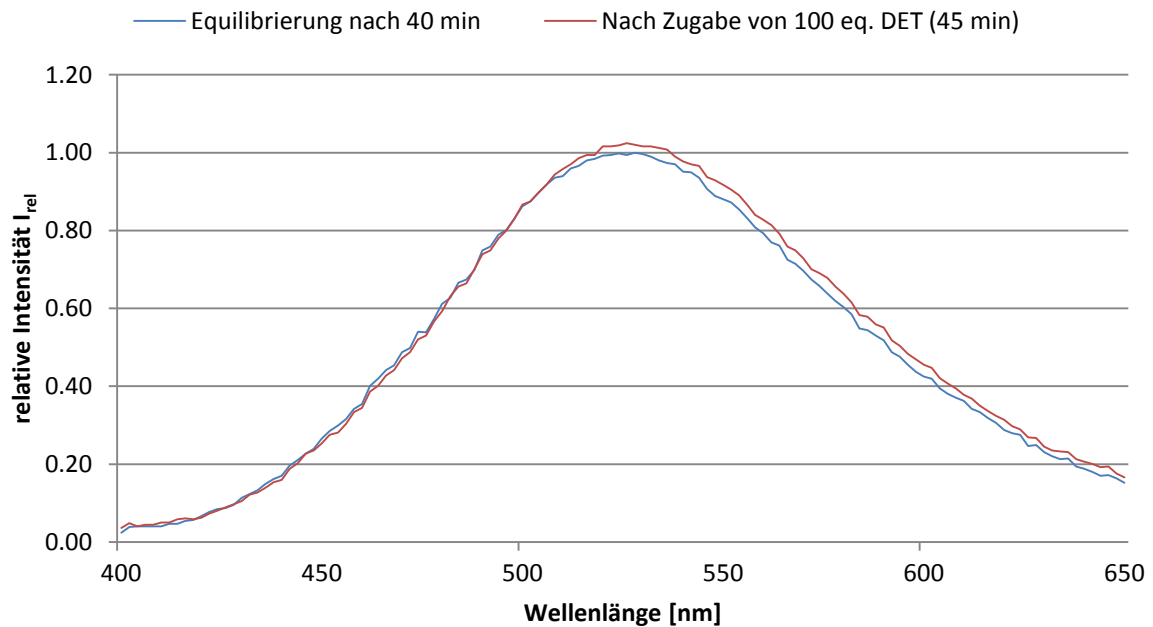


Abbildung 565: Änderung der relativen Intensitäten I_{rel} nach Zugabe von 100 eq. DET (6 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %).

- **Dotierung mit je 3.0 % der Rezeptoren 67 und 121 und TREN (114) als Botenstoff**

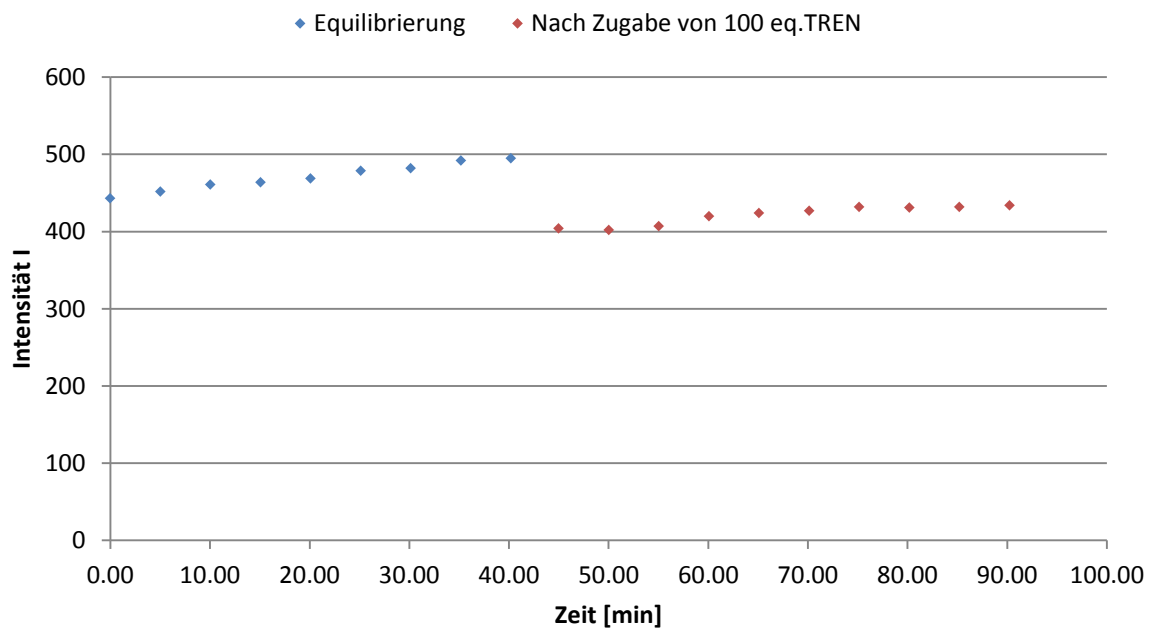


Abbildung 566: Zeitliche Änderung der Fluoreszenzintensität I vor und nach Zugabe von 100 eq. TREN (114) (6 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %).

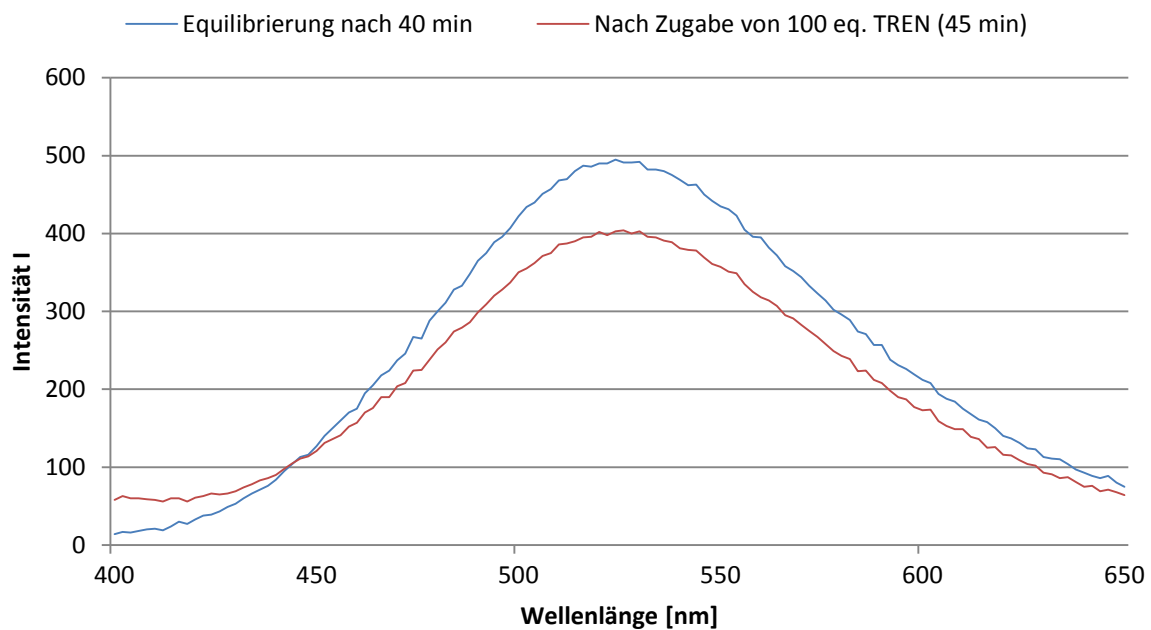


Abbildung 567: Emissionsspektren vor und nach Zugabe von 100 eq. TREN (114) (6 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %).

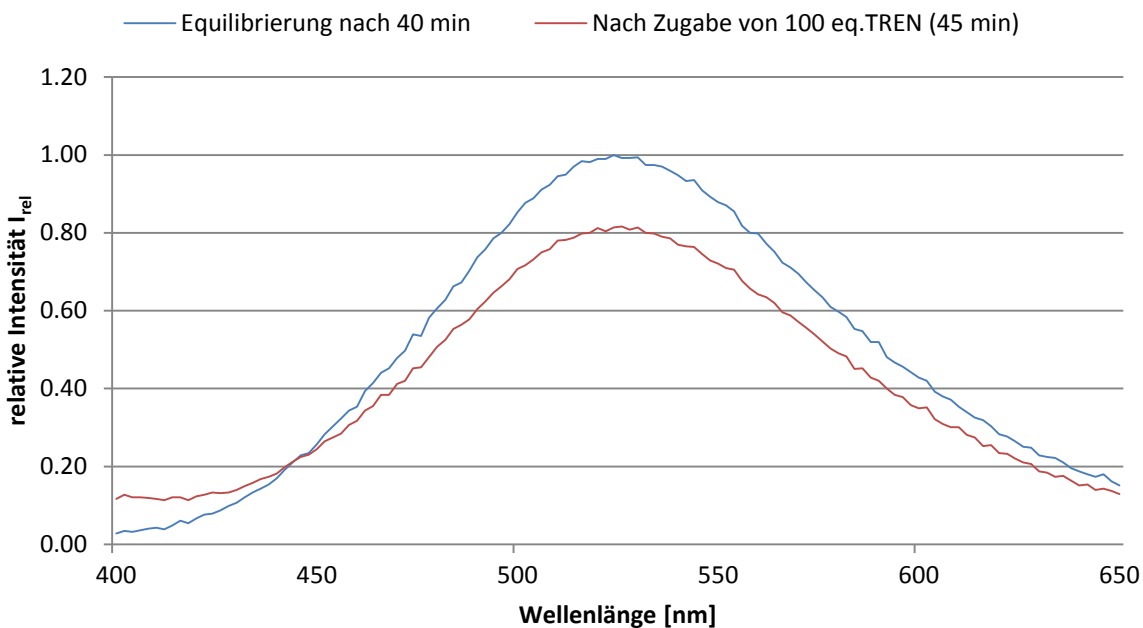


Abbildung 568: Änderung der relativen Intensitäten I_{rel} nach Zugabe von 100 eq. TREN (114) (6 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %).

Tabelle 35: Zusammenfassung der Ergebnisse mit je 3.0 % Dotierung der Transmembranbausteine 67 und 121.

	Vor Zugabe von 100 eq. EDA			Nach Zugabe von 100 eq. EDA			proz. Änderung	$\Delta\lambda_{\text{max}}$ (Em)/[nm]
	λ_{max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität	λ_{max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität		
Dansyl	526	489	1.0	520	450	0.92	-8%	-6
	Vor Zugabe von 100 eq. DET			Nach Zugabe von 100 eq. DET			proz. Änderung	$\Delta\lambda_{\text{max}}$ (Em)/[nm]
	λ_{max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität	λ_{max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität		
Dansyl	528	494	1.0	528	502	1.0	0%	0
	Vor Zugabe von 100 eq. TREN			Nach Zugabe von 100 eq. TREN			proz. Änderung	$\Delta\lambda_{\text{max}}$ (Em)/[nm]
	λ_{max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität	λ_{max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität		
Dansyl	524	495	1.0	518	398	0.80	-20%	-6

▪ Gegenüberstellung der Ergebnisse

Tabelle 36 zeigt die Zusammenfassung der Ergebnisse der Signaltransduktionsexperimente mit den Rezeptoren **67** und **121** mit unterschiedlicher Dotierung und unter Verwendung unterschiedlicher Botenstoffe.

Tabelle 36: Zusammenfassung der Signaltransduktionsexperimente mit den Rezeptoren 67 und 121.

Dotierung mit je 2.0% in DMPC/DPPC = 75%/25%								
Vor Zugabe von 100 eq. EDA			Nach Zugabe von 100 eq. EDA					
	λ_{\max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität	λ_{\max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität	proz. Änderung	$\Delta\lambda_{\max}$ (Em)/[nm]
Dansyl	530	470	1.0	524	430	0.93	-7%	-6
Vor Zugabe von 100 eq. DET			Nach Zugabe von 100 eq. DET					
	λ_{\max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität	λ_{\max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität	proz. Änderung	$\Delta\lambda_{\max}$ (Em)/[nm]
Dansyl	528	474	1.0	524	468	0.99	-1%	-4
Vor Zugabe von 100 eq. TREN			Nach Zugabe von 100 eq. TREN					
	λ_{\max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität	λ_{\max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität	proz. Änderung	$\Delta\lambda_{\max}$ (Em)/[nm]
Dansyl	526	475	1.0	526	398	0.84	-16%	0
Dotierung mit je 2.5% in DMPC/DPPC = 75%/25%								
Vor Zugabe von 100 eq. EDA			Nach Zugabe von 100 eq. EDA					
	λ_{\max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität	λ_{\max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität	proz. Änderung	$\Delta\lambda_{\max}$ (Em)/[nm]
Dansyl	526	466	1.0	526	466	1.0	0%	0
Vor Zugabe von 100 eq. DET			Nach Zugabe von 100 eq. DET					
	λ_{\max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität	λ_{\max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität	proz. Änderung	$\Delta\lambda_{\max}$ (Em)/[nm]
Dansyl	524	467	1.0	524	444	0.95	-5%	0
Vor Zugabe von 100 eq. TREN			Nach Zugabe von 100 eq. TREN					
	λ_{\max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität	λ_{\max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität	proz. Änderung	$\Delta\lambda_{\max}$ (Em)/[nm]
Dansyl	526	466	1.0	526	362	0.78	-22%	0
Dotierung mit je 3.0% in DMPC/DPPC = 75%/25%								
Vor Zugabe von 100 eq. EDA			Nach Zugabe von 100 eq. EDA					
	λ_{\max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität	λ_{\max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität	proz. Änderung	$\Delta\lambda_{\max}$ (Em)/[nm]
Dansyl	526	489	1.0	520	450	0.92	-8%	-6
Vor Zugabe von 100 eq. DET			Nach Zugabe von 100 eq. DET					
	λ_{\max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität	λ_{\max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität	proz. Änderung	$\Delta\lambda_{\max}$ (Em)/[nm]
Dansyl	528	494	1.0	528	502	1.0	0%	0
Vor Zugabe von 100 eq. TREN			Nach Zugabe von 100 eq. TREN					
	λ_{\max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität	λ_{\max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität	proz. Änderung	$\Delta\lambda_{\max}$ (Em)/[nm]
Dansyl	524	495	1.0	518	398	0.80	-20%	-6

5.5.2 Signaltransduktionsexperimente mit den Rezeptoren 67 und 121 in Photopuffer 3

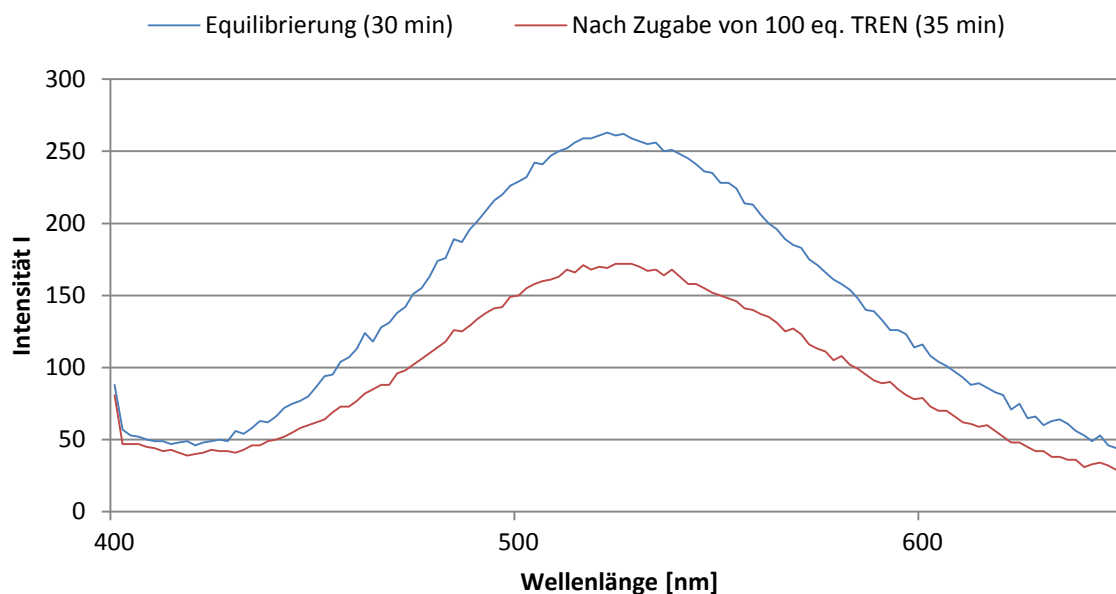


Abbildung 569: Emissionsspektren vor und nach Zugabe von 100 eq. TREN (114) (6 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %) in Photopuffer 3.

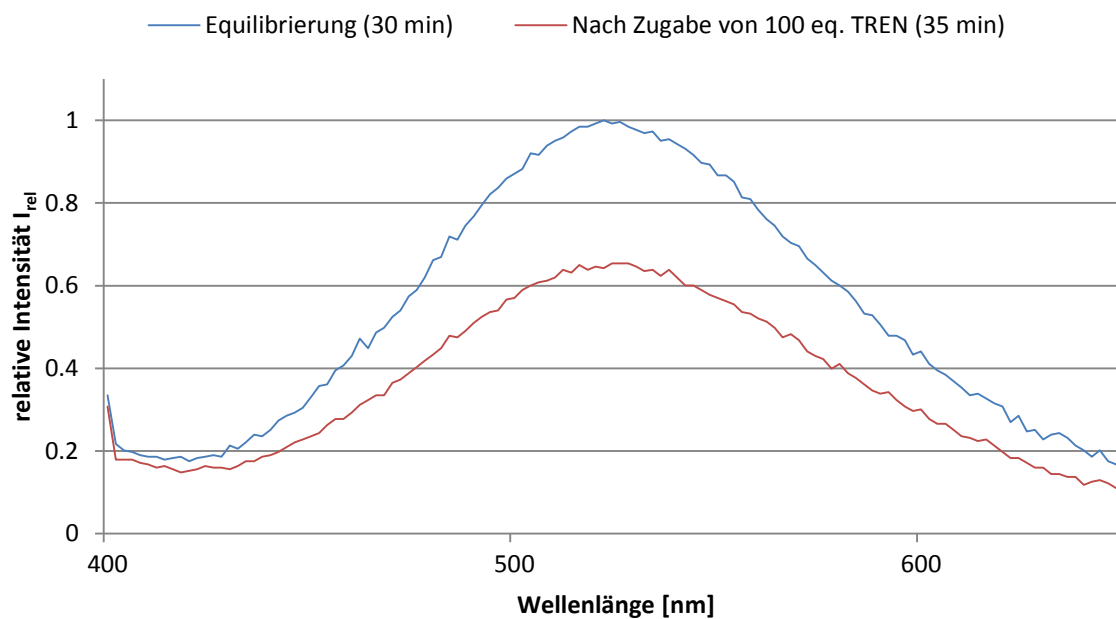


Abbildung 570: Änderung der relativen Intensitäten I_{rel} nach Zugabe von 100 eq. TREN (114) (6 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %) in Photopuffer 3.

Tabelle 37: Zusammenfassung der Ergebnisse mit je 3.0 % Dotierung der Transmembranbausteine 67 und 121 in Photopuffer 3.

	Vor Zugabe von 100 eq. TREN			Nach Zugabe von 100 eq. TREN			proz. Änderung	$\Delta\lambda_{max}$ (Em)/[nm]
	λ_{max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität	λ_{max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität		
Dansyl	520	261	1.0	516	170	0.65	-35%	-4

5.5.3 Signaltransduktionsexperimente mit den Rezeptoren **67** und **121** nach modifizierter Liposomenpräparation (Vereinigung der Bausteine **67** und **121** im fertigen Liposom)

▪ Präparation der Stammlösungen von **67** und **121**

Zur Präparation 10^{-4} bzw. 10^{-3} molarer Stammlösungen der Transmembranbausteine **67** und **121** wurden 17.9 mg ($1.171 \cdot 10^{-5}$ mol) **67** in 1.171 mL $\text{CH}_3\text{Cl}/\text{MeOH} = 9:1$ und 8.7 mg ($5.825 \cdot 10^{-6}$ mol) **121** in 582.5 μL MeOH gelöst. Aus diesen je 10^{-2} molaren Lösungen wurden über eine Verdünnungsreihe die 10^{-4} molare Stammlösung des Rezeptors **67** (Lösungsmittel: Chloroform/MeOH = 9:1) und die 10^{-3} molare Stammlösung des Rezeptors **121** (Lösungsmittel: MeOH) erhalten. Die Stammlösungen wurden bei -18°C gelagert.

▪ Liposomenpräparation und Fluoreszenzmessungen

Für die folgenden Experimente wurden Liposomen mit einer Dotierung von 2.5 % der Transmembranbausteine **67** und **121** in einer Lipidmatrix aus DMPC/DPPC = 75 % - 25 % verwendet. Entsprechend der Tabelle 3 und Tabelle 4 wurden 600 μL der Transmembranbausteinlösung ($c = 10^{-4}$ mol/L) **67** mit 750 μL der DMPC-Stammlösung ($c = 2$ mmol/L) und 250 μL DPPC-Stammlösung ($c = 2$ mmol/L) versetzt. Das Gemisch wurde am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt und anschließend für min. 3 h gefriergetrocknet. Der resultierende Film wurde in 940 μL MES-Puffer (375 mmol, pH = 5.5) aufgenommen und für min. 30 sec gevortext. Anschließend wurden 60 μL der 10^{-3} molaren Stammlösung des Transmembranbausteins **121** in MeOH zu der wässrigen Liposomen-Lösung gegeben. Die Liposomenlösung wurde zur Herstellung unilamellarer Liposomen auf 30°C erwärmt und für weitere 2 min gevortext. Danach wurde die so erhaltene Liposomenlösung 19-mal (ungerade Anzahl an Extrusionszyklen) durch eine 200 nm Polycarbonatmembran extrudiert (Details: siehe 5.4).

300 μL der wässrigen Liposomenlösung wurden in eine Microtiterplatte der Marke *Falcon Black Flat* überführt und die Lösung über einen Zeitraum von 60 min equilibriert und gleichzeitig auf 25°C temperiert. Als Referenz wurde eine Basislinie (400-650 nm) gegen den verwendeten MES-Puffer **1** gemessen. Während der Equilibrierung wurde alle 90 sec ein Übersichtsspektrum (400-650 nm, Bandbreite 2 nm) gemessen und die Intensitätswerte der Emissionsmaxima des FRET-Donors **67** bestimmt ($\lambda_{\text{ex}} = 330$ nm). Nach annähernder Konstanz der Intensitätsmaxima wurden 100 eq. Triethylentetramin (TREN) (**114**) zugegeben. Wiederum wurde über einen Zeitraum von 60 min alle 90 s ein Übersichtsspektrum gemessen und die Intensitäten des Emissionsmaximums bestimmt.

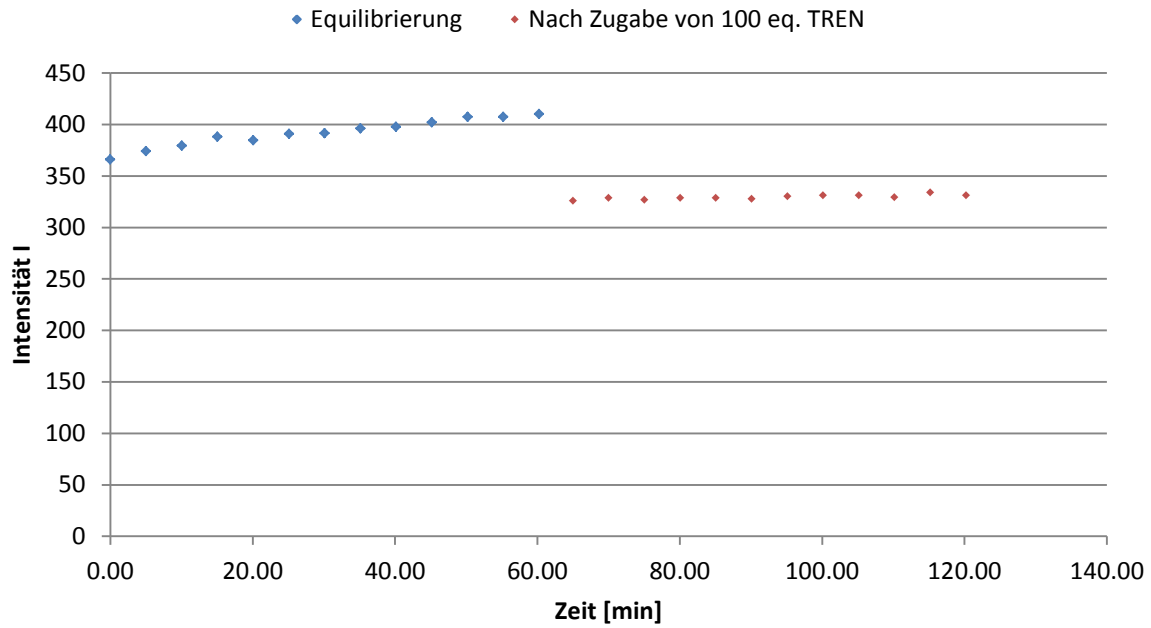


Abbildung 571: Zeitliche Änderung der Fluoreszenzintensität I vor und nach Zugabe von 100 eq. TREN (114) (6 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %).

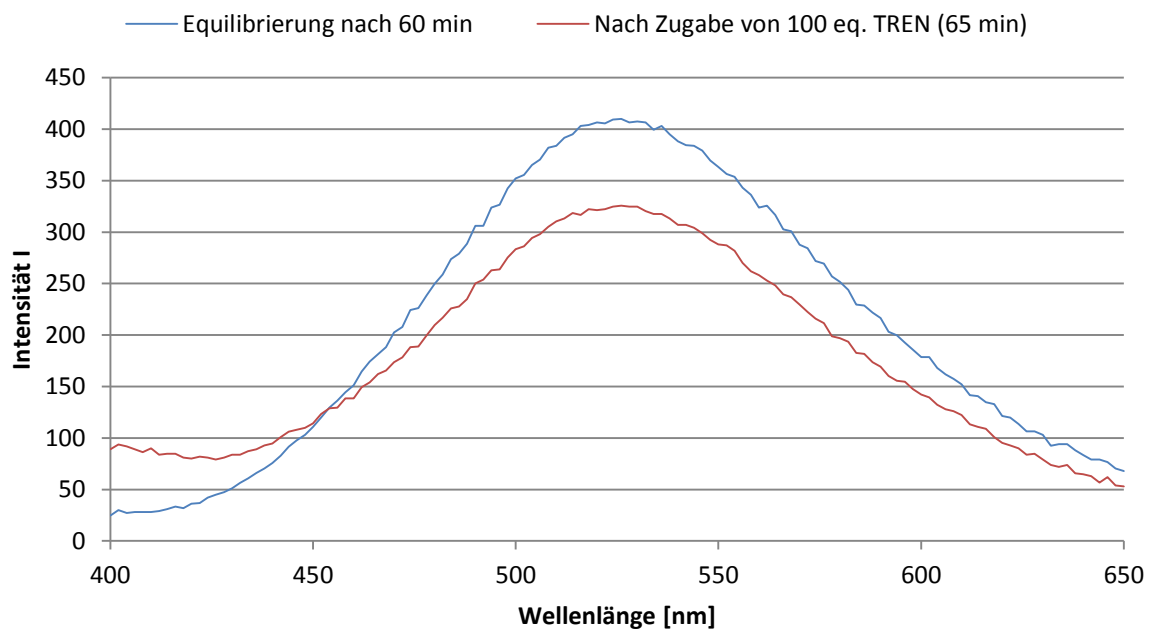


Abbildung 572: Emissionsspektren vor und nach Zugabe von 100 eq. TREN (114) (6 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %).

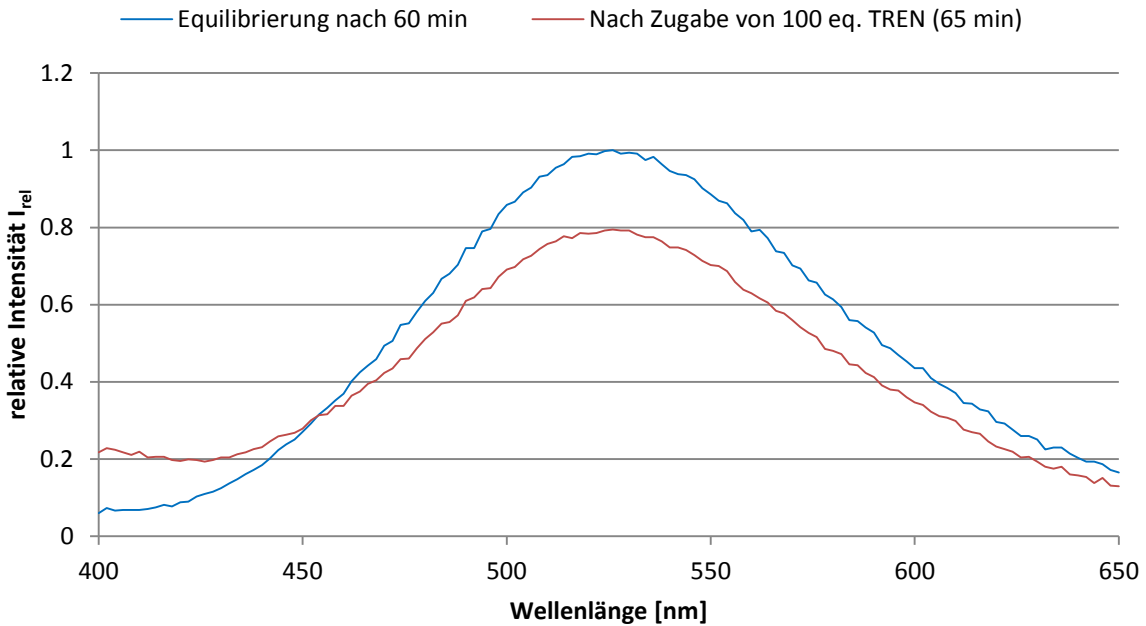


Abbildung 573: Änderung der relativen Intensitäten I_{rel} nach Zugabe von 100 eq. TREN (114) (6 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %).

5.5.4 Bestimmung der Einlagerungsgeometrie

5.5.4.1 Experimente mit dem Transmembranbaustein 119

■ UV-Vis- und Fluoreszenzspektren des Rezeptors 110 in Lösung

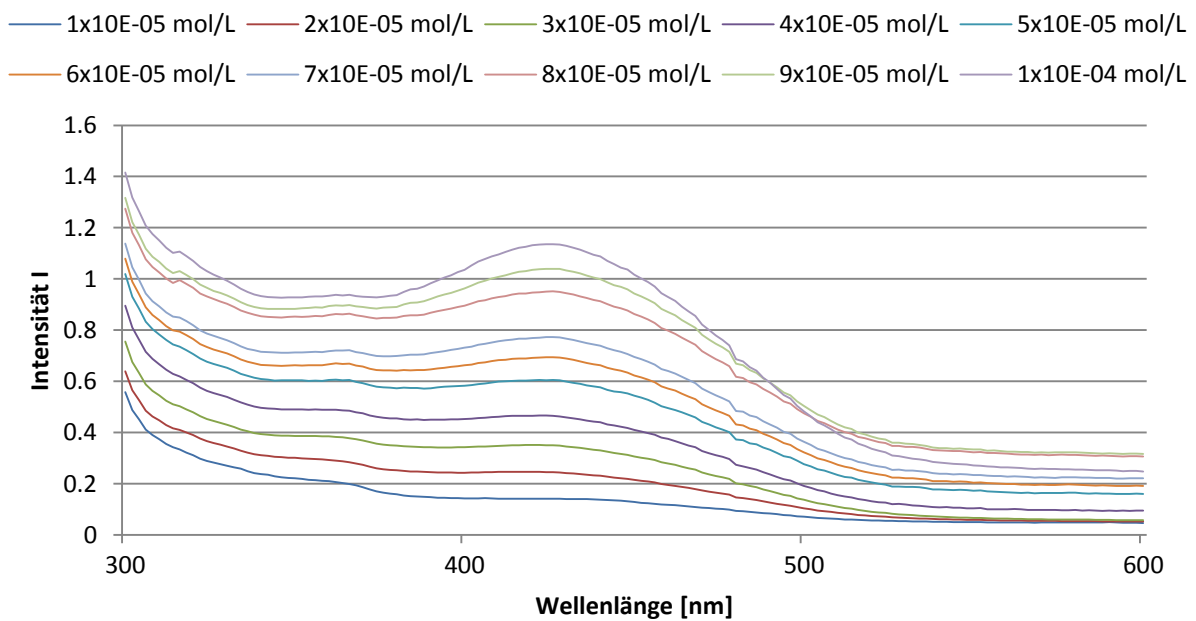


Abbildung 574: Absorptionsspektren von 110 ($c = 10^{-5} \text{ mol/L} - 10^{-4} \text{ mol/L}$) in MeOH.

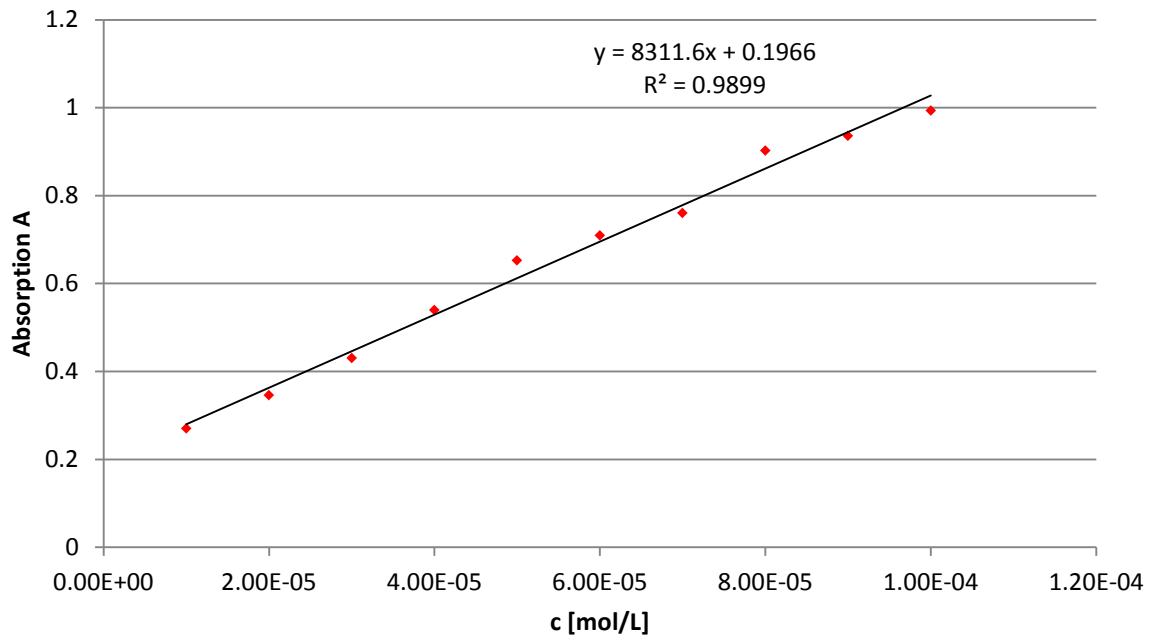


Abbildung 575: Absorptionwerte der Dansylkomponente ($\lambda = 330$ nm).

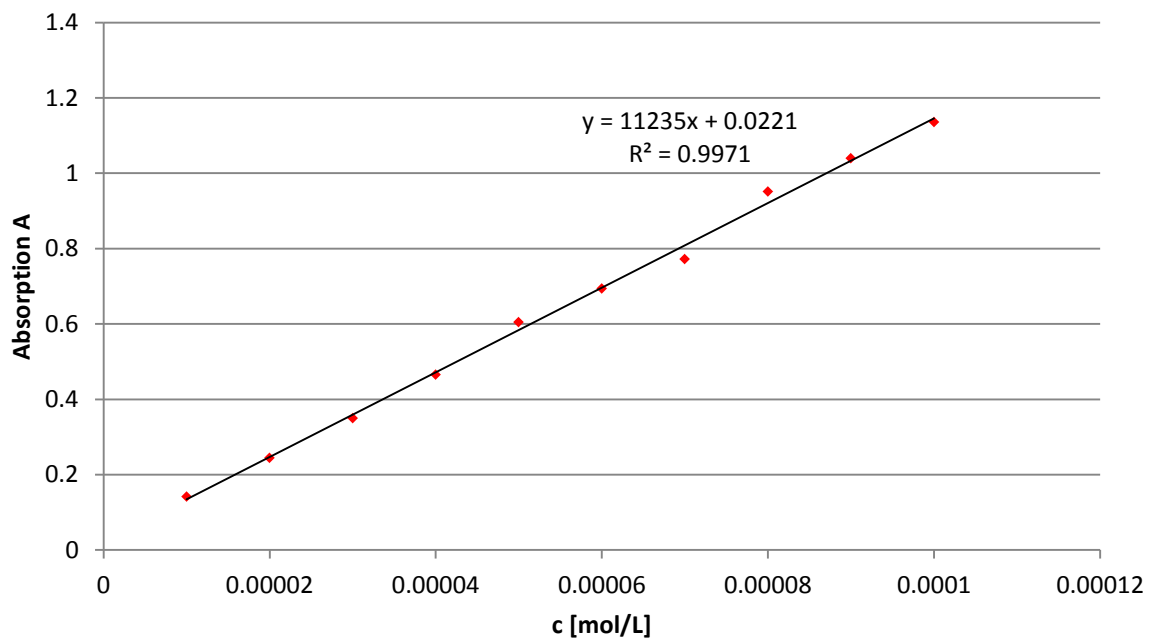


Abbildung 576: Absorptionwerte der Dabcylkomponente ($\lambda = 426$ nm).

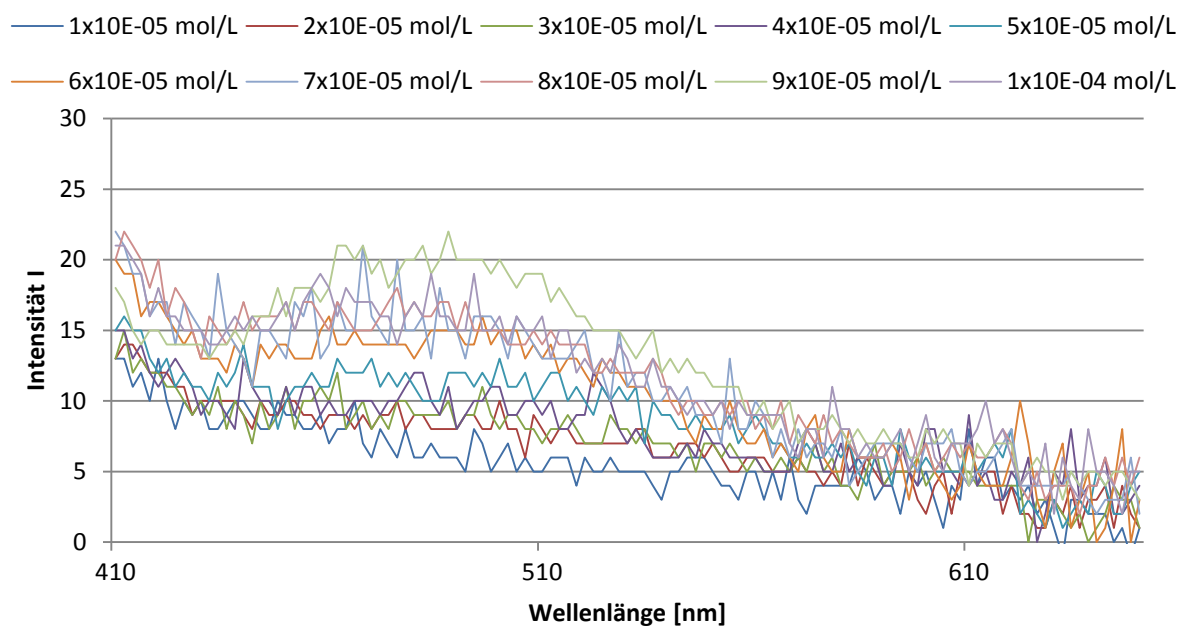


Abbildung 577: Emissionsspektren von 110 ($c = 10^{-5}$ mol/L - 10^{-4} mol/L) in MeOH ($\lambda_{\text{Ex}} = 330$ nm).

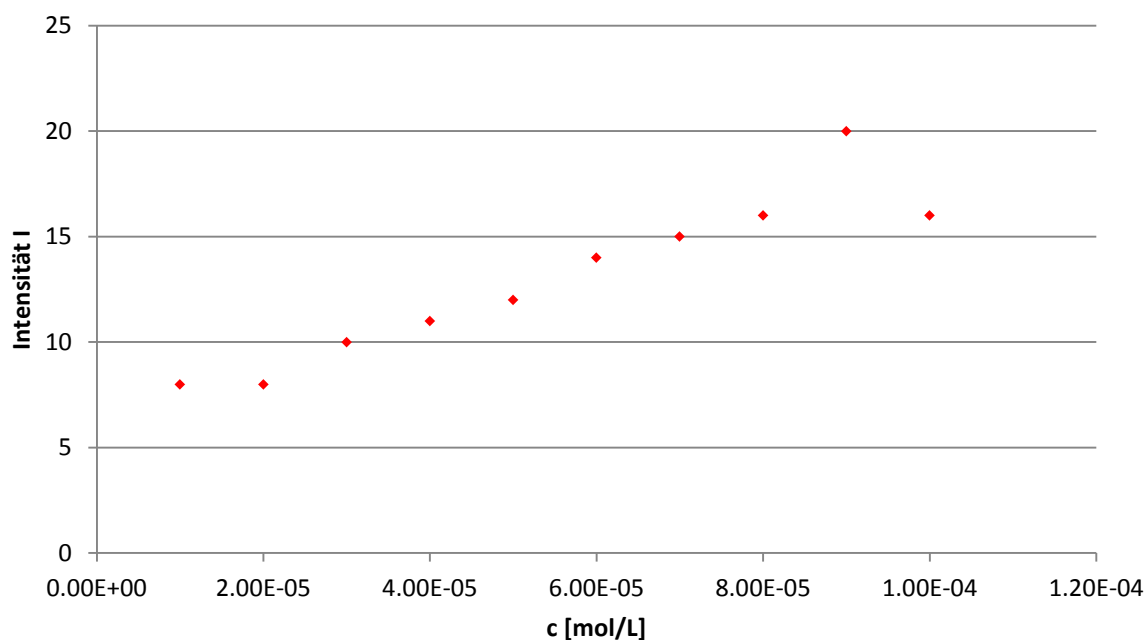


Abbildung 578: Fluoreszenzintensitäten der Dansylkomponente ($\lambda = 478$ nm; $\lambda_{\text{Ex}} = 330$ nm).

▪ Präparation der Stammlösung von 110

Zur Präparation einer 10^{-4} molaren Stammlösung des Transmembranbausteins **110** wurden 3.7 mg ($2.548 \cdot 10^{-6}$ mol) in 254.8 μL MeOH gelöst. Aus dieser 10^{-2} molaren Lösung wurde über eine Verdünnungsreihe die 10^{-4} molare Stammlösung erhalten (Lösungsmittel: MeOH). Die Stammlösung wurde bei -18°C gelagert.

▪ Liposomenpräparation und Fluoreszenzmessungen

Für die folgenden Experimente wurden Liposomen mit einer Dotierung von 0.5 % - 5.0 % des Transmembranbausteins **110** in einer Lipidmatrix aus DMPC/DPPC = 75 % - 25 % verwendet. Entsprechend der Tabelle 3 und Tabelle 4 wurden die Transmembranbausteinlösung ($c = 10^{-4}$ mol/L) mit 750 μL der DMPC-Stammlösung ($c = 2$ mmol/L) und 250 μL DPPC-Stammlösung ($c = 2$ mmol/L) versetzt. Die Präparation der Liposomen erfolgte entsprechend der Vorschrift 5.4. Je 300 μL der wässrigen Liposomenlösung wurden in eine Microtiterplatte der Marke *Falcon Black Flat* überführt und die Lösung über einen Zeitraum von min. 40 min equilibriert und gleichzeitig auf 25°C temperiert. Als Referenz wurde eine Basislinie (400-650 nm) gegen den verwendeten MES-Puffer **1** gemessen. Während der Equilibrierung wurde alle 90 sec ein Übersichtsspektrum (400-650 nm, Bandbreite 2 nm) gemessen und die Intensitätswerte der Emissionsmaxima des FRET-Donors bestimmt ($\lambda_{\text{Ex}} = 330$ nm).

▪ Einlagerungsexperimente mit DMPC/DPPC-Liposomen

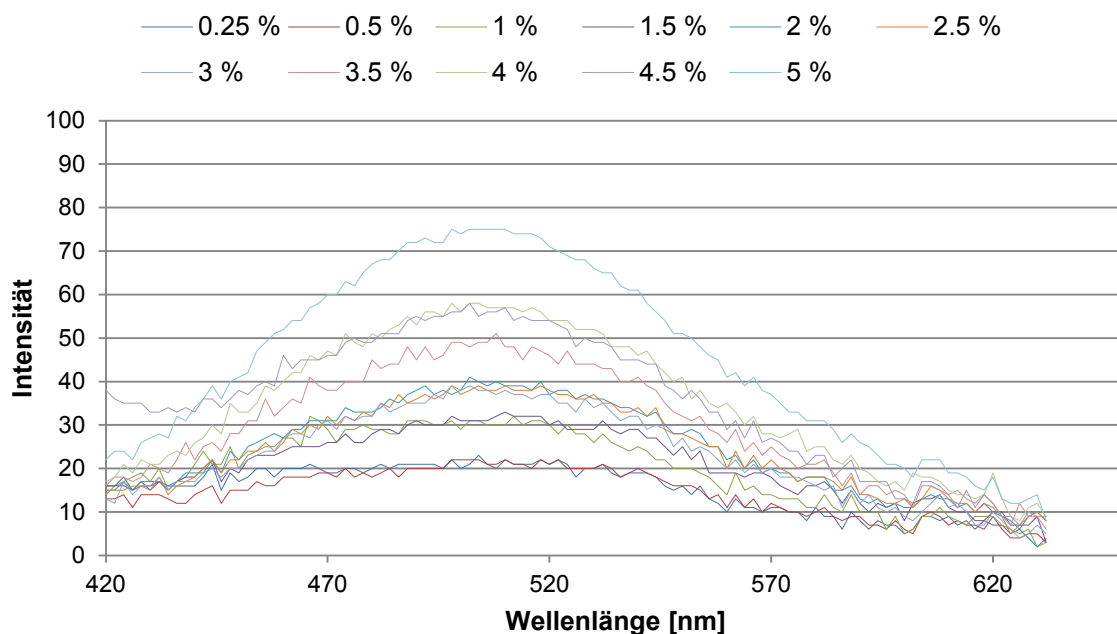


Abbildung 579: Einlagerung des Transmembranbausteins 110 (0.25 % - 5.0 %) in DPPC/DMPC = 75 % - 10 %.

5.6 Signaltransduktionsexperimente mit den Rezeptor 123

■ UV-Vis- und Fluoreszenzspektren des Rezeptors 123 in Lösung

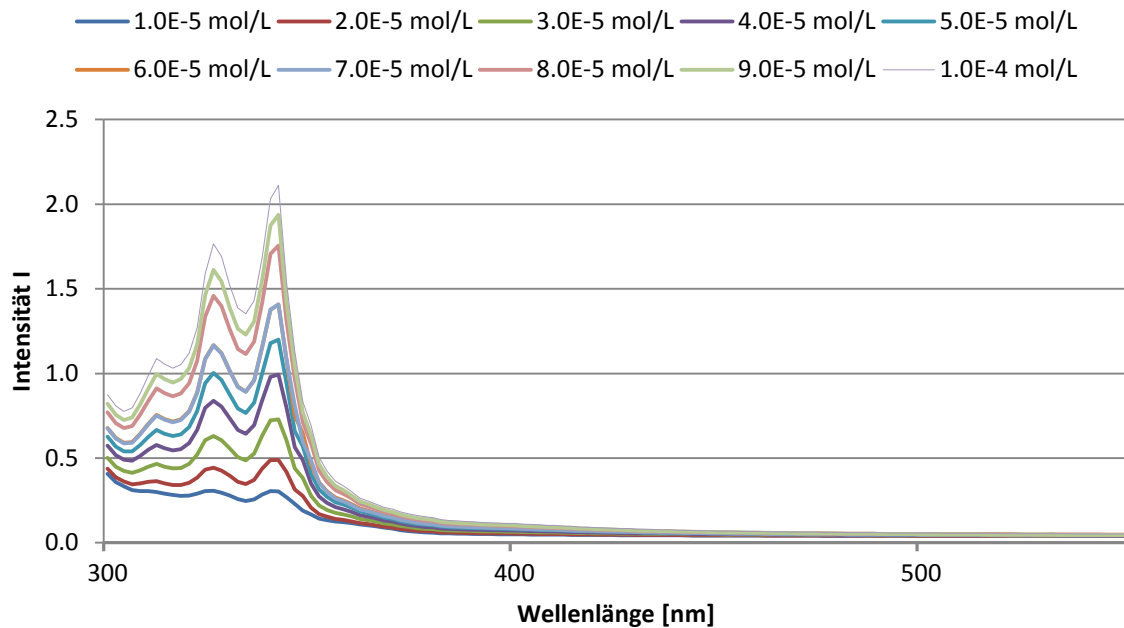


Abbildung 580: Absorptionsspektren von 123 ($c = 10^{-5}$ mol/L - 10^{-4} mol/L) in MeOH.

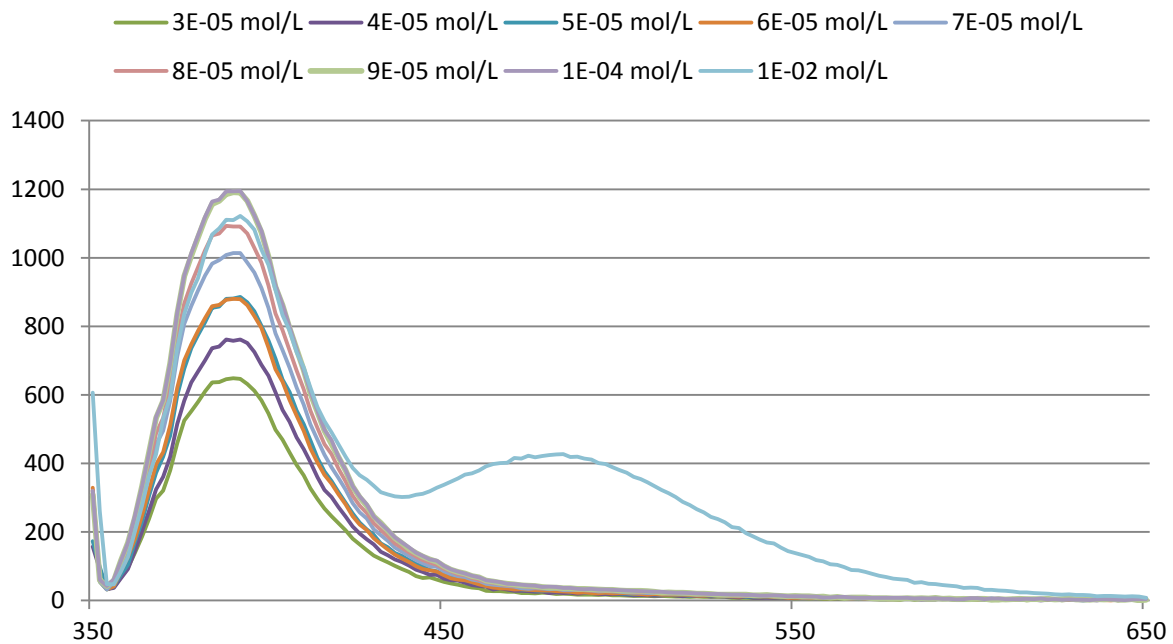


Abbildung 581: Emissionsspektren von 123 ($c = 3 \times 10^{-5}$ mol/L - 10^{-4} mol/L und 10^{-2} mol/L) in MeOH ($\lambda_{\text{EX}} = 340$ nm).

5.6.1 Einlagerung des halben Bausteins 130 in DMPC/DPPC-Liposomen

▪ Präparation der Stammlösung von 130

Zur Präparation einer 10^{-4} molaren Stammlösung des Transmembranbausteins **130** wurden 9.4 mg (1.29×10^{-4} mol) in 12.93 mL MeOH gelöst. Aus dieser 10^{-2} molaren Lösung wurde über eine Verdünnungsreihe die 10^{-4} molare Stammlösung erhalten (Lösungsmittel: MeOH). Die Stammlösung wurde bei -18°C gelagert.

▪ Liposomenpräparation und Fluoreszenzmessungen

Für die folgenden Experimente wurden Liposomen mit einer Dotierung von 1.0 % -15.0 % des Transmembranbausteins **130** in einer Lipidmatrix aus DMPC/DPPC = 75 % - 25 % verwendet. Entsprechend der Tabelle 3 und Tabelle 4 wurden die Transmembranbausteinlösung ($c = 10^{-4}$ mol/L) mit 750 μL der DMPC-Stammlösung ($c = 2$ mmol/L) und 250 μL DPPC-Stammlösung ($c = 2$ mmol/L) versetzt. Die Präparation der Liposomen erfolgte entsprechend der Vorschrift 5.4. Je 300 μL der wässrigen Liposomenlösung wurden in eine Microtiterplatte der Marke *Falcon Black Flat* überführt und die Lösung über einen Zeitraum von min. 40 min equilibriert und gleichzeitig auf 25°C temperiert. Als Referenz wurde eine Basislinie (360-760 nm) gegen den verwendeten MES-Puffer **1** gemessen. Während der Equilibrierung wurde alle 90 sec ein Übersichtsspektrum (360-760 nm, Bandbreite 2 nm) gemessen und die Intensitätswerte der Emissionsmaxima des Fluorophors **130** bestimmt ($\lambda_{\text{Ex}} = 340$ nm).

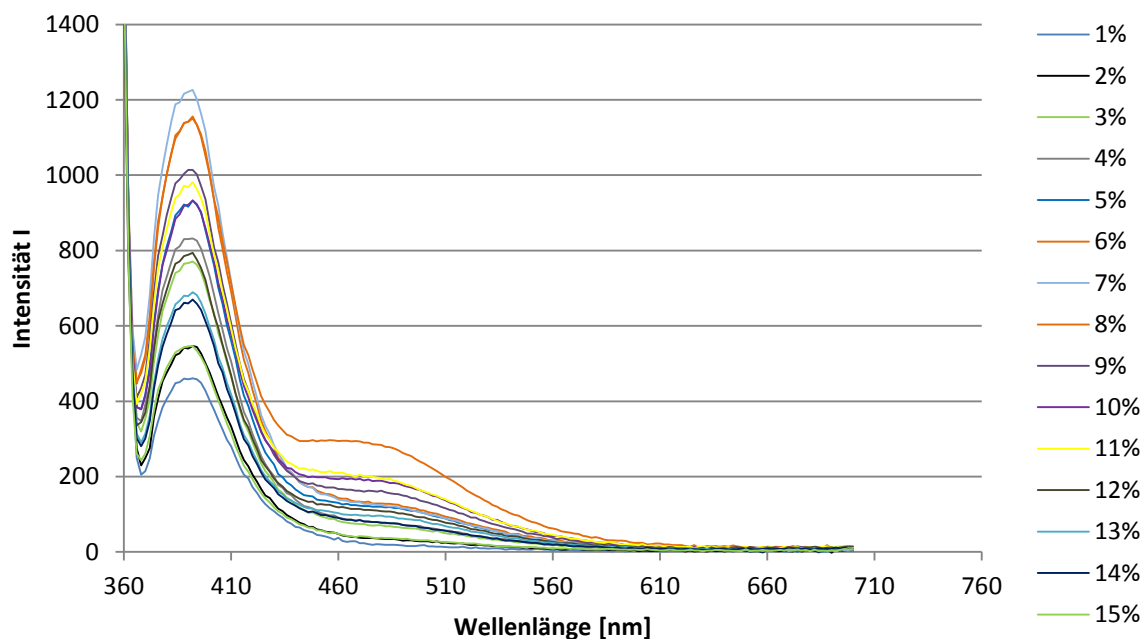


Abbildung 582: Emissionsspektren von **130** (1 % - 15 %) in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %.

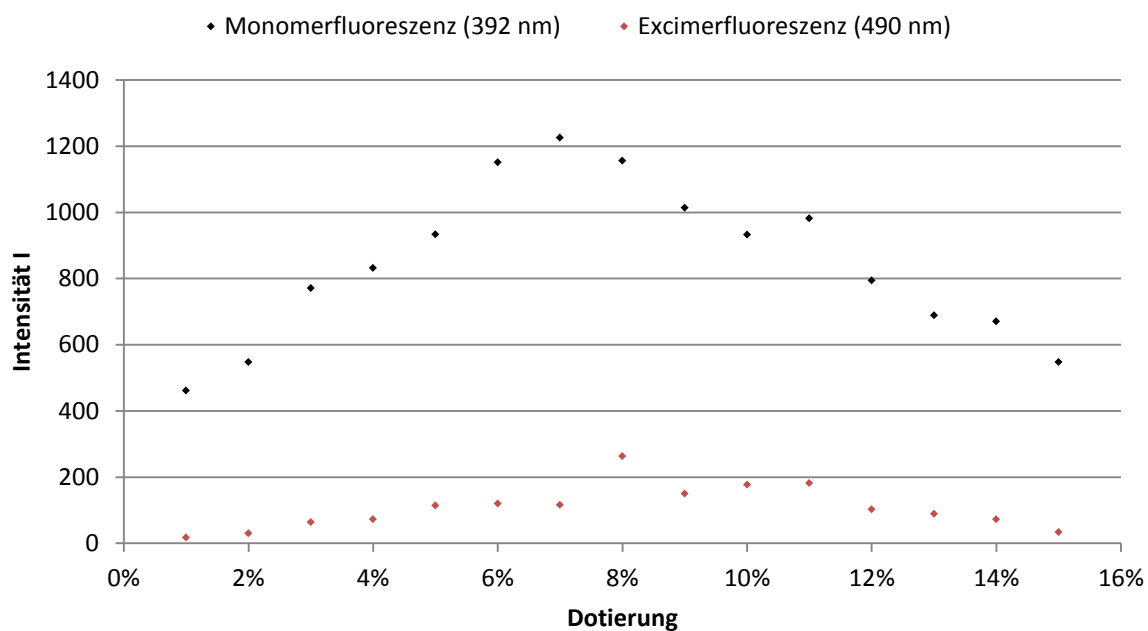


Abbildung 583: Fluoreszenzintensitäten I der Monomer- und Eximerfluoreszenz ($\lambda = 392$ nm bzw. $\lambda = 490$ nm).

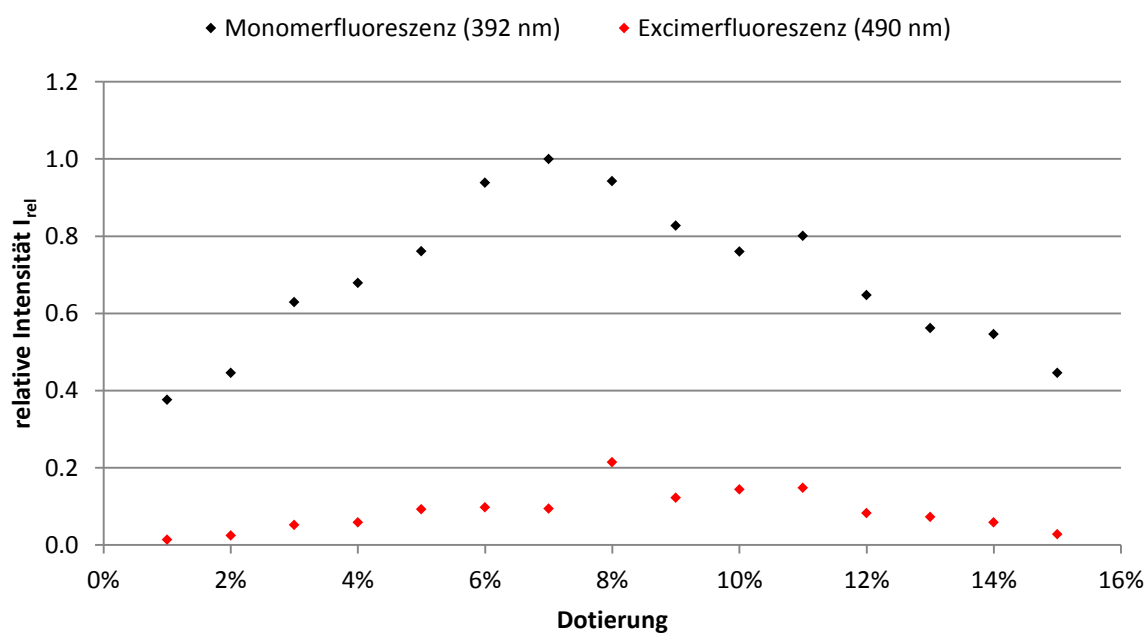


Abbildung 584: Relative Fluoreszenzintensitäten I_{rel} der Monomer- und Eximerfluoreszenz ($\lambda = 392$ nm bzw. $\lambda = 490$ nm).

Tabelle 38: Zusammenfassung der Ergebnisse.

Dotierung [%]	Monomerfluoreszenz ($\lambda = 392$ nm)			Excimerfluoreszenz ($\lambda = 490$ nm)		
	λ_{max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität	λ_{max} (Em)/[nm]	abs. Intensität	rel. Intensität
1.0	390	461	0.38	490	17	0.01
2.0	390	547	0.45	490	30	0.02
3.0	390	771	0.63	490	64	0.05
4.0	390	832	0.68	490	72	0.06
5.0	390	933	0.76	490	114	0.09
6.0	390	1151	0.94	490	120	0.1
7.0	390	1226	1.0	490	116	0.09
8.0	390	1156	0.94	490	263	0.21
9.0	390	1014	0.82	490	150	0.12
10.0	390	932	0.76	490	177	0.14
11.0	390	982	0.80	490	182	0.15
12.0	390	794	0.65	490	102	0.08
13.0	390	689	0.56	490	89	0.07
14.0	390	670	0.55	490	72	0.06
15.0	390	547	0.45	490	34	0.03

5.6.2 Signaltransduktionsexperimente mit dem Rezeptor 123 in DMPC/DPPC-Liposomen

▪ Präparation der Stammlösung von 123

Zur Präparation einer 10^{-4} molaren Stammlösung des Transmembranbausteins **123** wurden 6.9 mg ($4.647 \cdot 10^{-6}$ mol) in 4.647 mL MeOH gelöst. Aus dieser 10^{-3} molaren Lösung wurde über eine Verdünnungsreihe die 10^{-4} molare Stammlösung erhalten (Lösungsmittel: MeOH). Die Stammlösung wurde bei -18 °C gelagert.

▪ Liposomenpräparation und Fluoreszenzmessungen

Für die folgenden Experimente wurden Liposomen mit einer Dotierung von 5.0 %, 10.0 % und 15.0 % des Transmembranbausteins **123** in einer Lipidmatrix aus DMPC/DPPC = 75 % - 25 % verwendet. Entsprechend der Tabelle 3 und Tabelle 4 wurden die Transmembranbausteinlösung ($c = 10^{-4}$ mol/L) mit 750 μ L der DMPC-Stammlösung ($c = 2$ mmol/L) und 250 μ L DPPC-Stammlösung ($c = 2$ mmol/L) versetzt. Die Präparation der Liposomen erfolgte entsprechend der Vorschrift 5.4. Je 300 μ L der wässrigen Liposomenlösung wurden in eine Microtiterplatte der Marke *Falcon Black Flat* überführt und die Lösung über einen Zeitraum von min. 40 min equilibriert und gleichzeitig auf 25 °C temperiert. Als Referenz wurde eine Basislinie (360-760 nm) gegen den verwendeten MES-Puffer **1** gemessen. Während der Equilibrierung wurde alle 90 sec ein Übersichtsspektrum (360-760 nm, Bandbreite 2 nm) gemessen und die Intensitätswerte der Monomer-bzw. Excimeremission des Fluorophors **123** bestimmt ($\lambda_{\text{Ex}} = 340$ nm). Nach annähernder Konstanz der Intensitätsmaxima wurden 100 eq. Triethyltetramin (TREN) (**114**) zugegeben.

▪ **Dotierung mit 5.0 % des Rezeptors 123 und TREN (114) als Botenstoff**

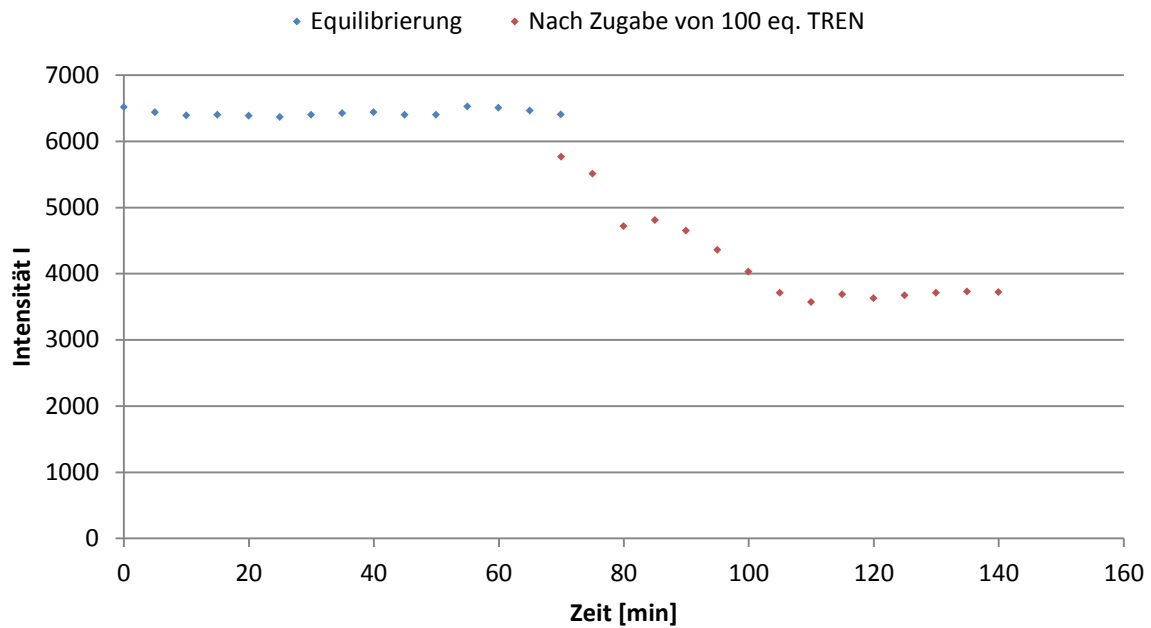


Abbildung 585: Zeitliche Änderung der Fluoreszenzintensität I ($\lambda_{\text{Ex}} = 392 \text{ nm}$) vor und nach Zugabe von 100 eq. TREN (114) (5 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %).

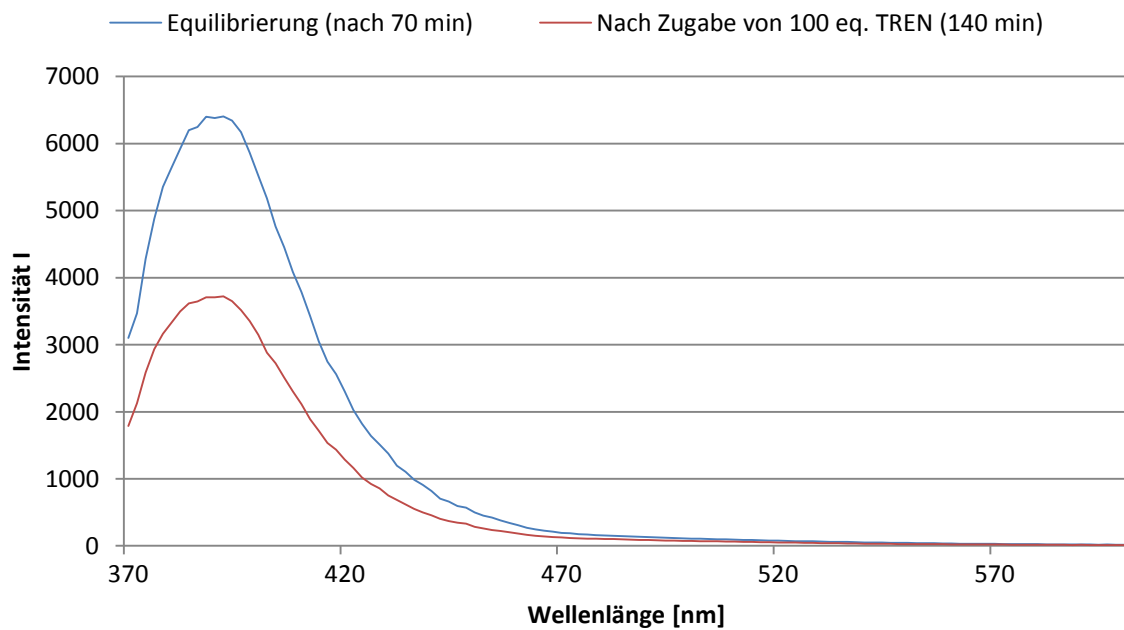


Abbildung 586: Emissionsspektren vor und nach Zugabe von 100 eq. TREN (114) (5 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %).

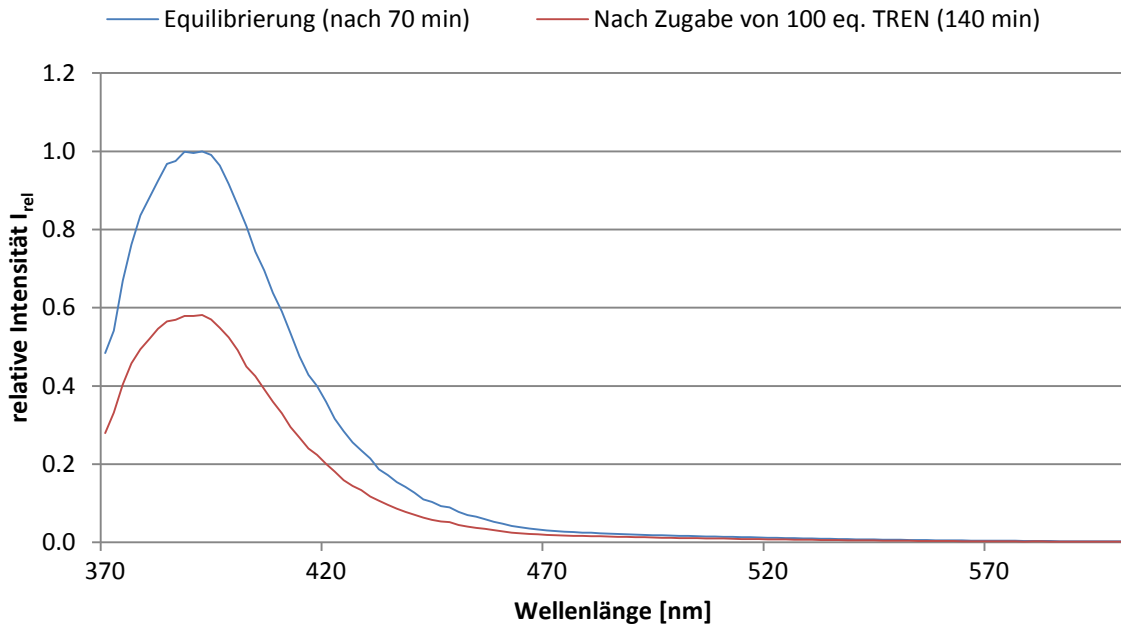


Abbildung 587: Änderung der relativen Intensitäten I_{rel} nach Zugabe von 100 eq. TREN (114) (5 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %).

▪ **Dotierung mit 10.0 % des Rezeptors 123 und TREN (114) als Botenstoff**

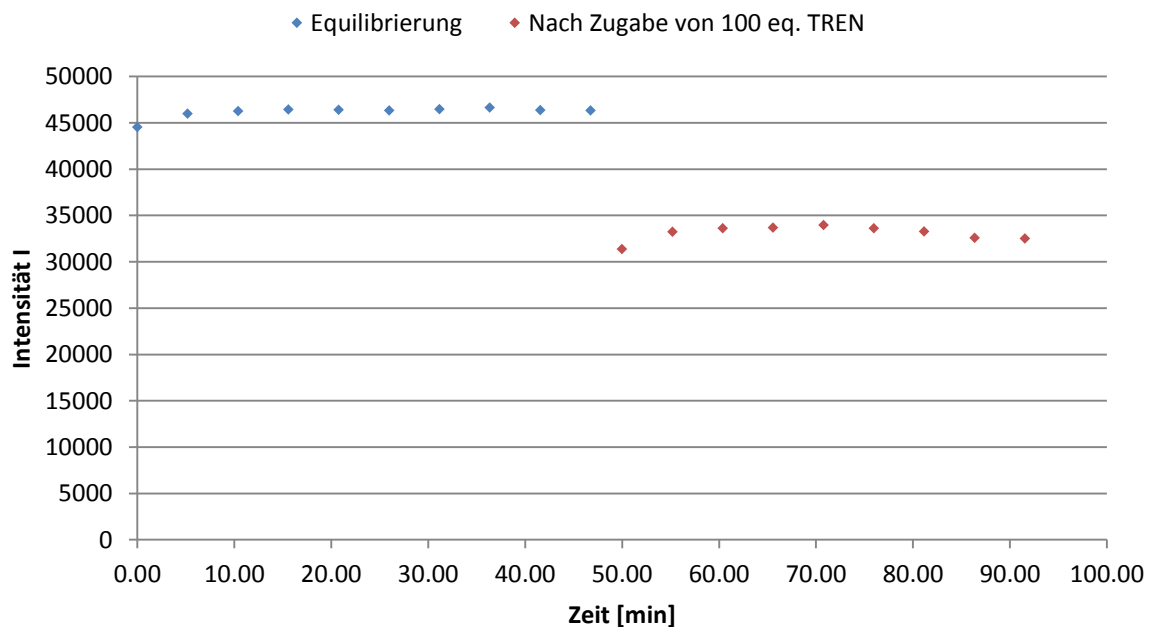


Abbildung 588: Zeitliche Änderung der Monomer-Fluoreszenzintensität I ($\lambda_{EX} = 392$ nm) vor und nach Zugabe von 100 eq. TREN (114) (10 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %).

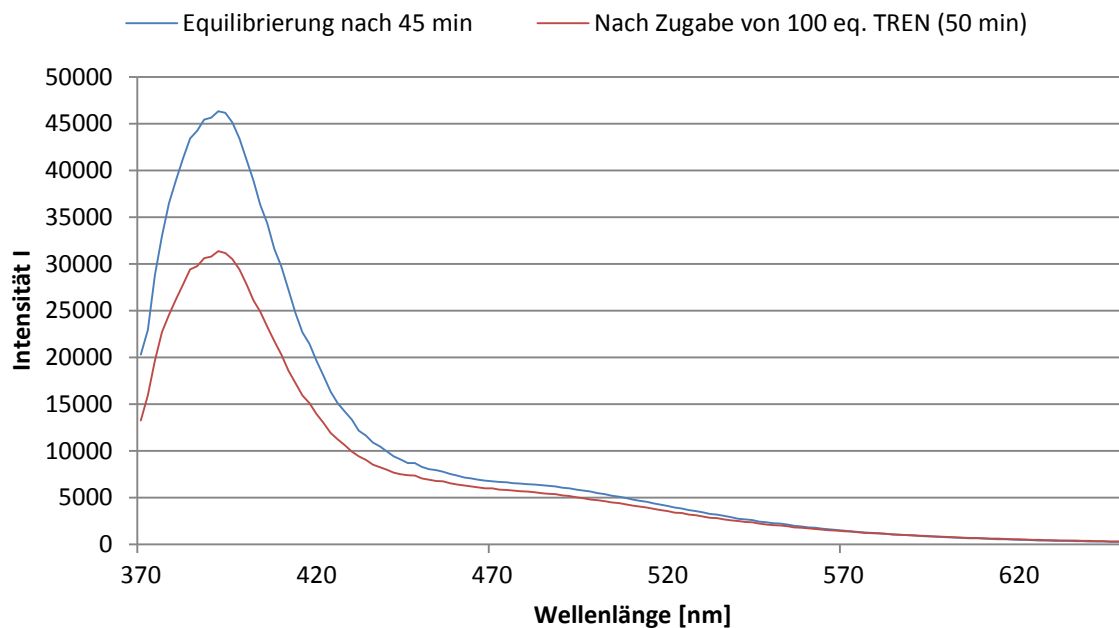


Abbildung 589: Emissionsspektren vor und nach Zugabe von 100 eq. TREN (114) (10 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %).

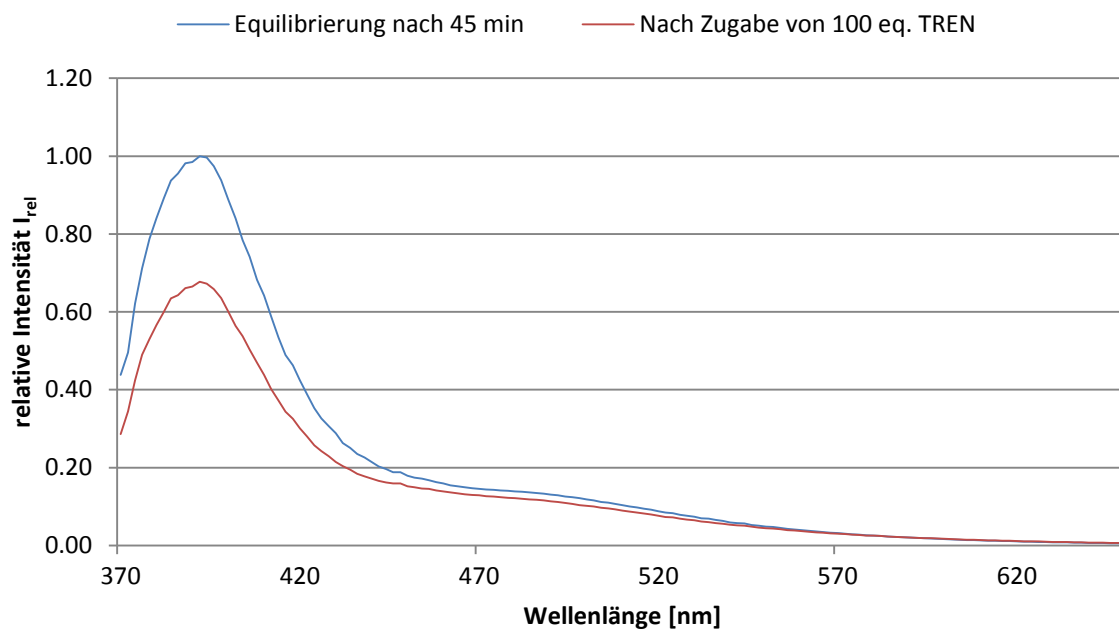


Abbildung 590: Änderung der relativen Intensitäten I_{rel} nach Zugabe von 100 eq. TREN (114) (10 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %).

▪ **Dotierung mit 15.0 % des Rezeptors 123 und TREN (114) als Botenstoff**

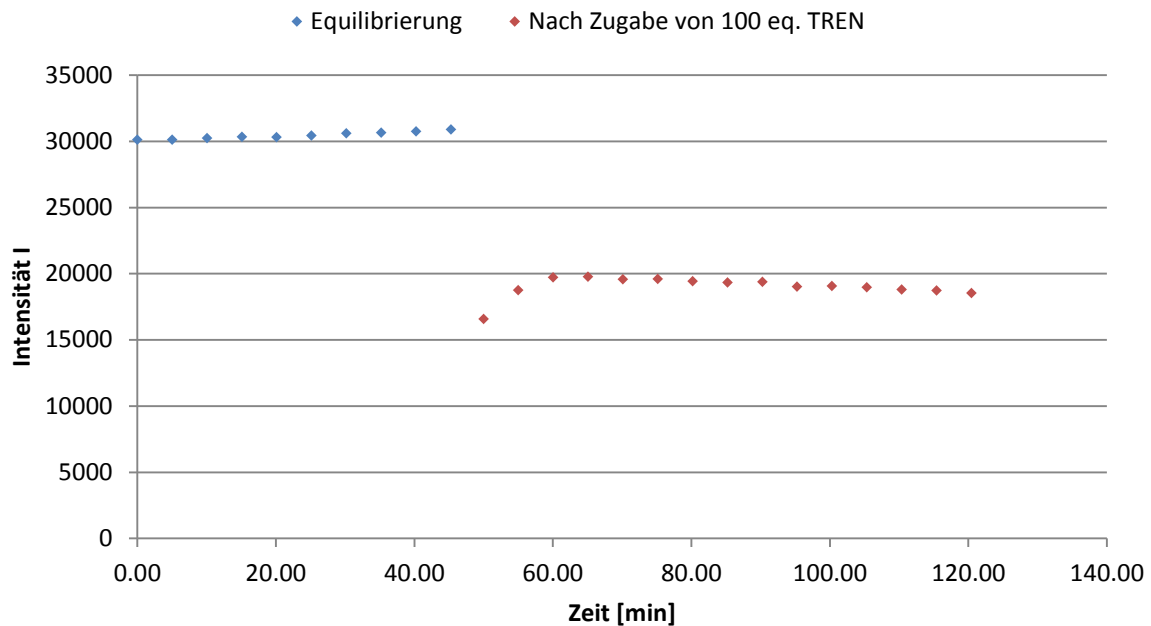


Abbildung 591: Zeitliche Änderung der Fluoreszenzintensität I ($\lambda_{\text{ex}} = 392 \text{ nm}$) vor und nach Zugabe von 100 eq. TREN (114) (15 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %).

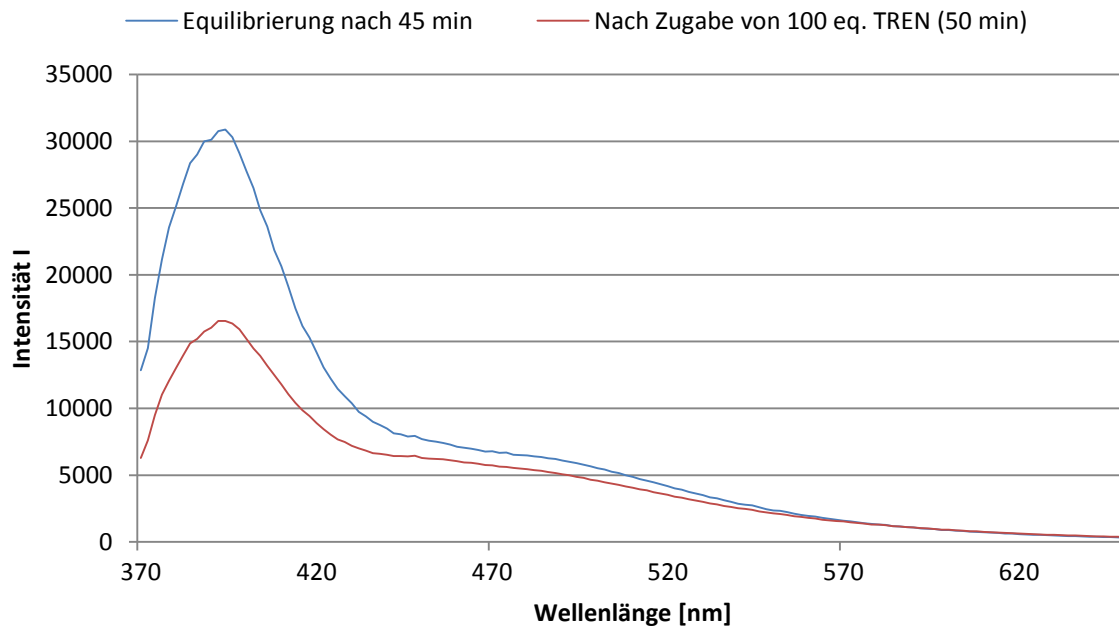


Abbildung 592: Emissionsspektren vor und nach Zugabe von 100 eq. TREN (114) (15 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %).

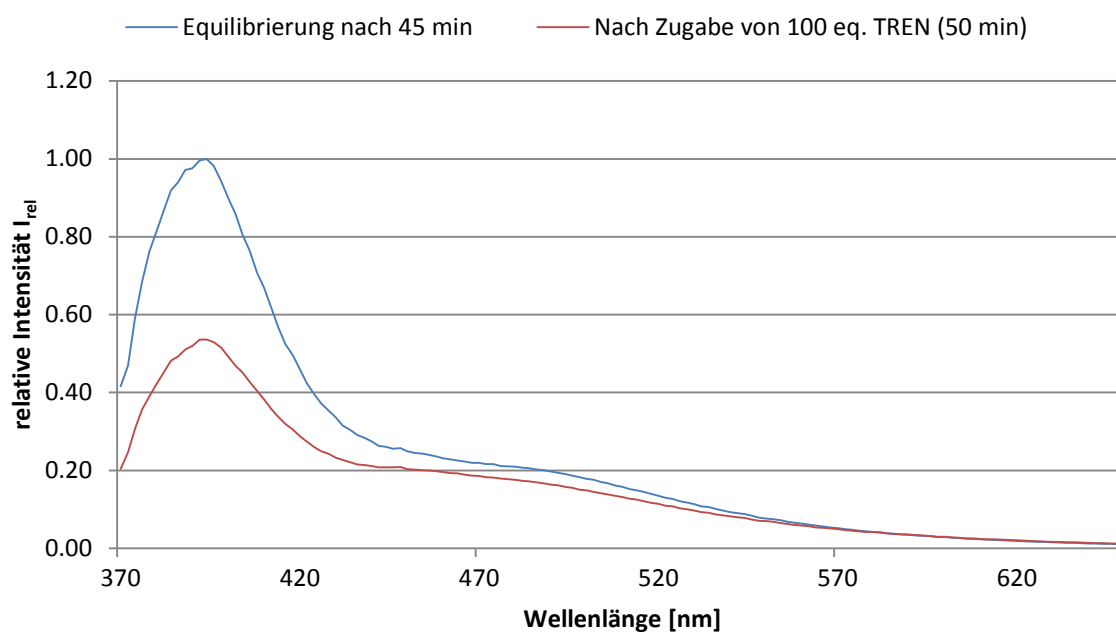


Abbildung 593: Änderung der relativen Intensitäten I_{rel} nach Zugabe von 100 eq. TREN (114) (15 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %).

5.7 Signaltransduktionsexperimente mit den Rezeptoren 138 und 139

▪ Präparation der Stammlösungen von 138 und 139

Zur Präparation 10^{-4} bzw. 10^{-3} molarer Stammlösungen der Transmembranbausteine **138** und **139** wurden 9.4 mg (7.06×10^{-6} mol) **138** in 0.706 mL $\text{CH}_3\text{Cl}/\text{MeOH} = 9:1$ und 7.0 mg (4.962×10^{-6} mol) **139** in 496.2 μL MeOH gelöst. Aus diesen je 10^{-2} molaren Lösungen wurden über eine Verdünnungsreihe die 10^{-4} molare Stammlösung des Rezeptors **138** (Lösungsmittel: Chloroform/MeOH = 9:1) und die 10^{-3} molare Stammlösung des Transmembranbausteins **139** (Lösungsmittel: MeOH) erhalten. Die Stammlösungen wurden bei -18°C gelagert.

▪ Liposomenpräparation und Absorptionsmessungen

a) Für die folgenden Experimente wurden Liposomen mit einer Dotierung von je 2.5 % der Transmembranbausteine **138** und **138** in einer Lipidmatrix aus DMPC/DPPC = 75 % - 25 % verwendet. Für die Referenzexperimente wurden die Rezeptoren **138** bzw. **139** mit einer Dotierung von 2.5 % einzeln eingelagert. Entsprechend der Tabelle 3 und Tabelle 4 wurden je 500 μL der Transmembranbausteinlösungen ($c = 10^{-4}$ mol/L) **138** und **139** mit 750 μL der DMPC-Stammlösung ($c = 2$ mmol/L) und 250 μL DPPC-Stammlösung ($c = 2$ mmol/L) versetzt. Das Gemisch wurde am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt und anschließend für min. 3 h gefriergetrocknet. Der resultierende Film wurde in 1 mL MES-Puffer (375 mmol, pH = 5.5, 0.5 mmol/L L-(-)-Ascorbinsäure) aufgenommen und für min. 30 sec gevortext. Die Liposomenlösung wurde zur Herstellung unilamellarer Liposomen auf 30°C erwärmt und für weitere 2 min gevortext. Danach wurde die so erhaltene Liposomenlösung 19-mal (ungerade Anzahl an Extrusionszyklen) durch eine 200 nm Polycarbonatmembran extrudiert.

300 μL der wässrigen Liposomenlösung wurden in eine Microtiterplatte der Marke *Falcon Flat Transparent* überführt und die Lösung über einen Zeitraum von 5-10 min equilibriert und gleichzeitig auf 25°C temperiert. Als Referenz wurde eine Basislinie (400-650 nm) gegen den verwendeten MES-Puffer mit einem Leer-Liposom aus einer Lipidmatrix aus DMPC/DPPC = 75 % - 25 % (2 mmol/L) gemessen. Während der Equilibrierung wurde alle 60 sec die Absorption bei 341 nm bestimmt. Nach annähernder Konstanz der Absorption wurden 50 eq. DET zugegeben. Wiederum wurde über einen Zeitraum von 10 min alle 60 s die Absorption bei 341 nm bestimmt. Nach weiteren 10 min wurden 10 eq. DTNB (**147**) (5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure) zugegeben und über einen Zeitraum von 10 min alle 60 s die Absorption bei 412 nm bestimmt. Nach Zugabe der Reagenzien wurde jeweils ein Übersichtsspektrum gemessen, um eventuell auftretende Trübungserscheinungen durch Zugabe

der Reagenzien ausschließen zu können. Die Präparation des wasserlöslichen DTNB (**147**) (Ellman's Reagenz) ist dem Kapitel 5.9.1 zu entnehmen.

b) Für die folgenden Experimente wurden Liposomen mit einer Dotierung von je 2.5 % der Transmembranbausteine **138** und **139** in einer Lipidmatrix aus DMPC/DPPC = 75 % - 25 % verwendet. Für die Referenzexperimente wurden die Rezeptoren **138** bzw. **139** mit einer Dotierung von 2.5 % einzeln eingelagert. Entsprechend der Tabelle 3 und Tabelle 4 wurden 500 μL der Transmembranbausteinlösung ($c = 10^{-4} \text{ mol/L}$) **138** mit 750 μL der DMPC-Stammlösung ($c = 2 \text{ mmol/L}$) und 250 μL DPPC-Stammlösung ($c = 2 \text{ mmol/L}$) versetzt. Das Gemisch wurde am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt und anschließend für min. 3 h gefriergetrocknet. Der resultierende Film wurde in 950 μL MES-Puffer ($c = 375 \text{ mmol/L}$, $\text{pH} = 5.5$, 0.5 mmol/L L-(-)-Ascorbinsäure) aufgenommen und für min. 30 sec gevortext. Anschließend wurden 50 μL der 10^{-3} molaren Stammlösung des Transmembranbausteins **139** in MeOH zu der wässrigen Liposomenlösung gegeben. Die Liposomenlösung wurde zur Herstellung unilamellarer Liposomen auf 30°C erwärmt und für weitere 2 min gevortext. Danach wurde die so erhaltene Liposomenlösung 19-mal (ungerade Anzahl an Extrusionszyklen) durch eine 200 nm Polycarbonatmembran extrudiert. Die Absorptionsmessungen wurden in analoger Weise zu der unter Methode a) beschriebenen Weise durchgeführt.

5.7.1 Signaltransduktionsexperimente mit den Rezeptoren 138 und 139, DET als Botenstoff und DTNB (147) zum Nachweis extravesikulärer Thiolgruppen

1. Referenzmessungen mit dem Rezeptor 138 mit freier Thiolfunktion nach Methode a)

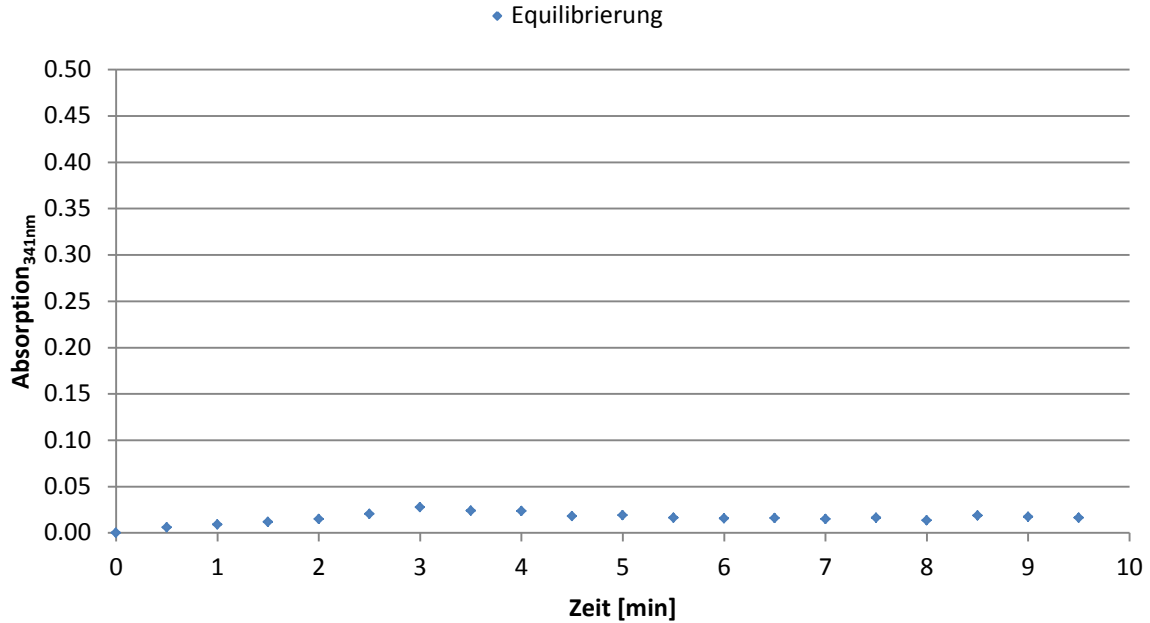


Abbildung 594: Einlagerung des Rezeptors 138 mit freier Thiolfunktion (2.5 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %) - Equilibrierung.

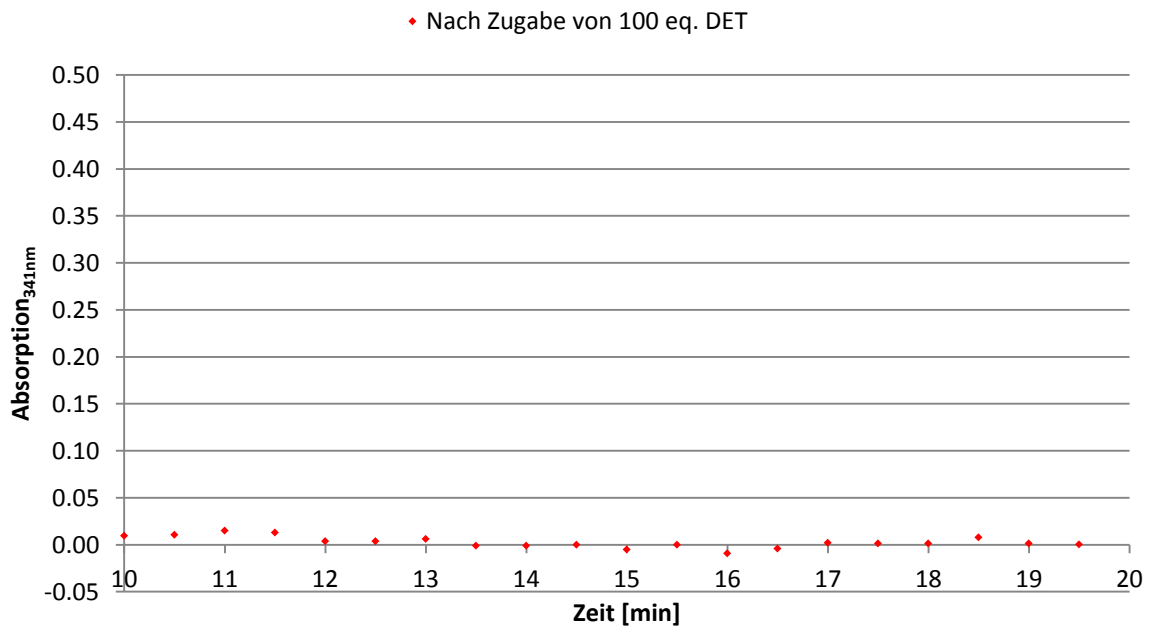


Abbildung 595: Einlagerung des Rezeptors 138 mit freier Thiolfunktion (2.5 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %) - Zugabe von 100 eq. DET.

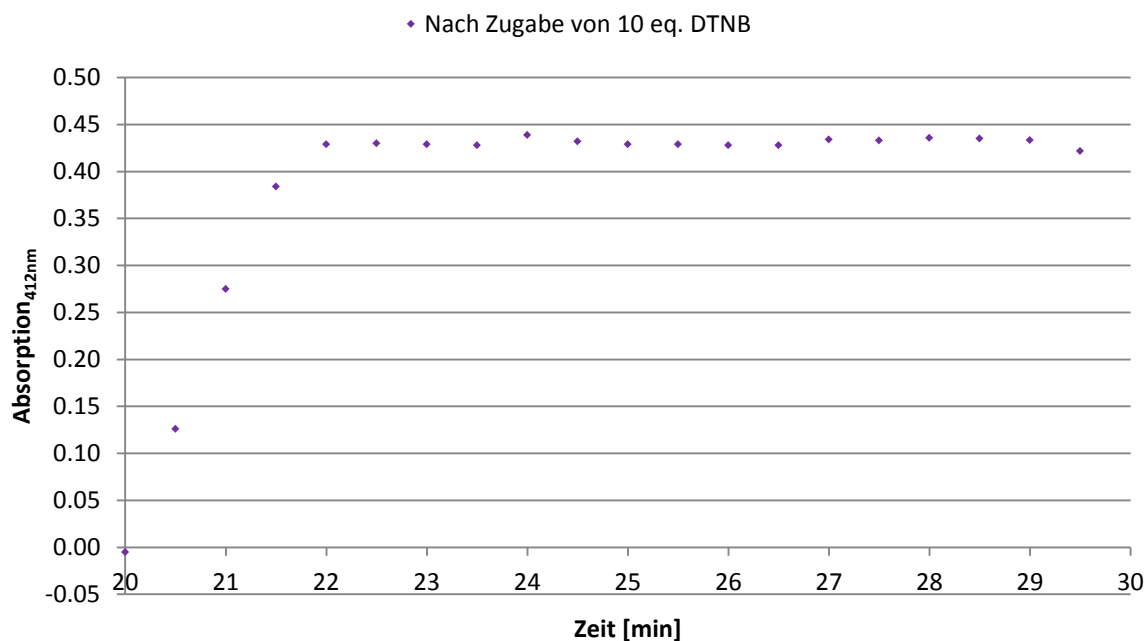


Abbildung 596: Einlagerung des Rezeptors 138 mit freier Thiolfunktion (2.5 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %) – Zugabe von 10 eq. DTNB (147).

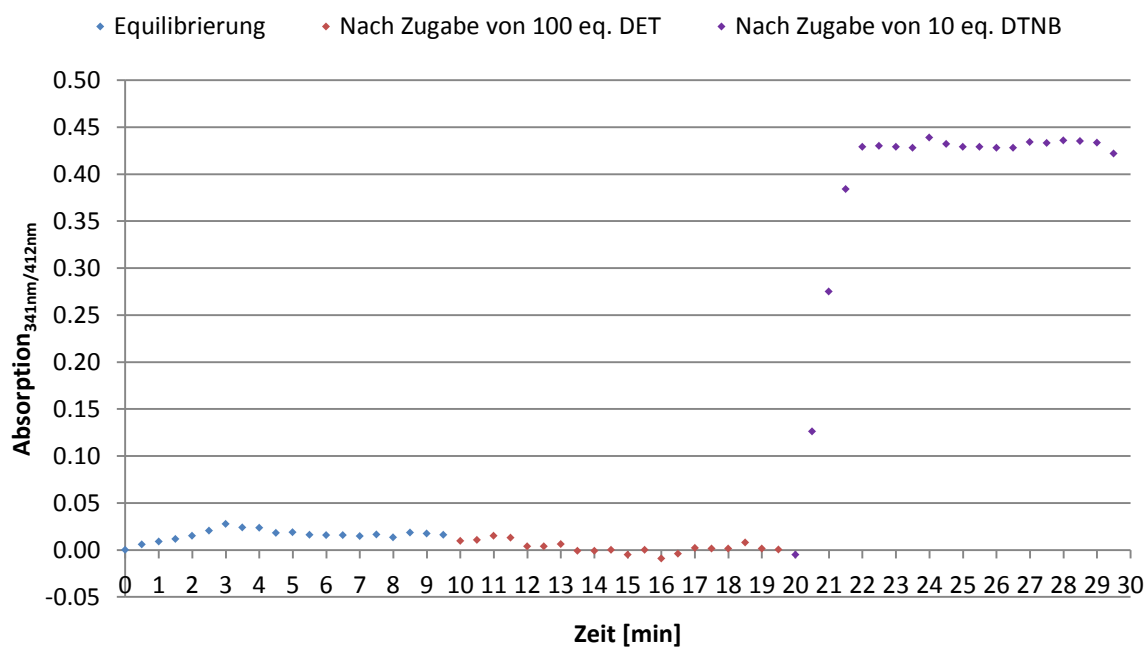


Abbildung 597: Einlagerung des Rezeptors 138 mit freier Thiolfunktion (2.5 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %) – Zeitliche Abfolge der Reagenzienzugabe.

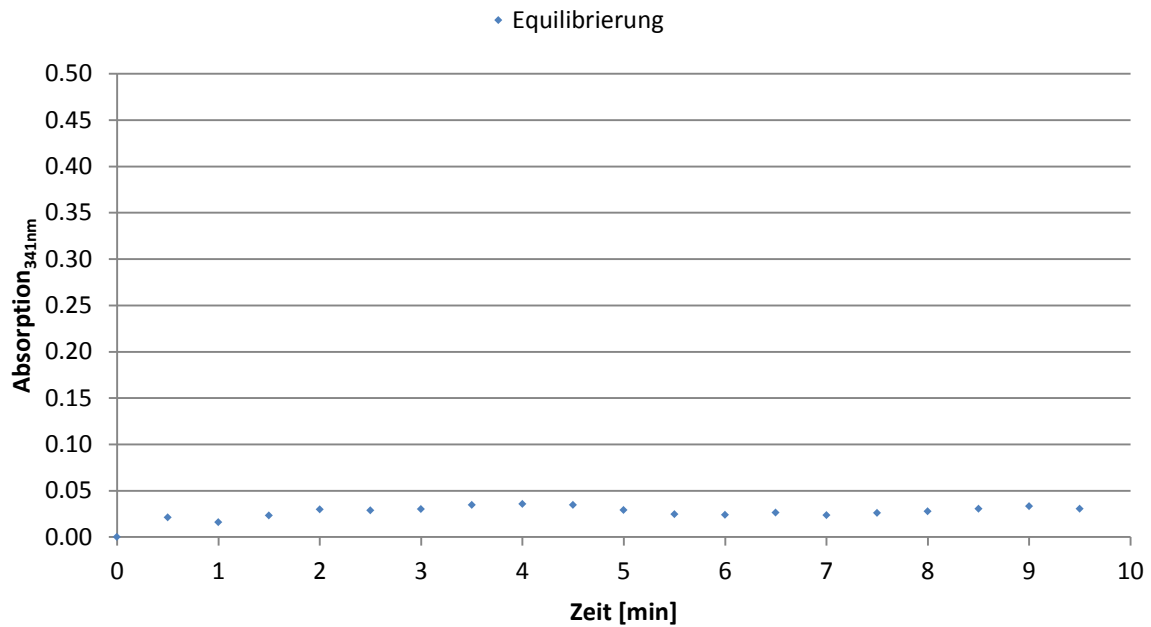
2. Referenzmessungen mit dem Rezeptor 139 mit Disulfidfunktion nach Methode a)

Abbildung 598: Einlagerung des Rezeptors 139 mit Disulfidfunktion (2.5 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %). - Equilibrierung.

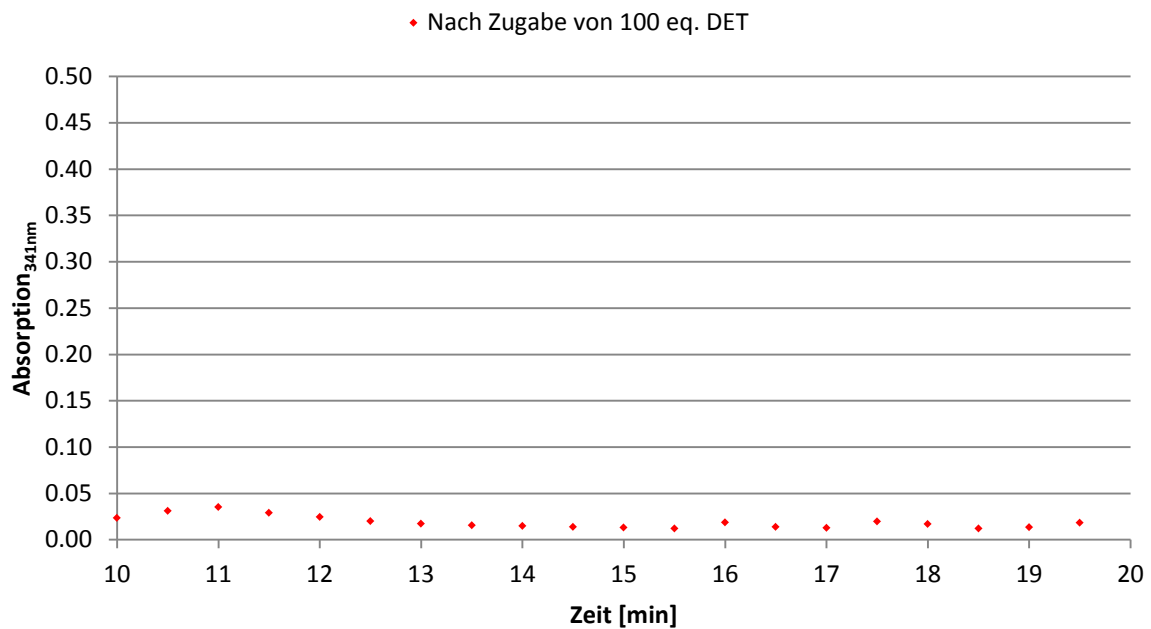


Abbildung 599: Einlagerung des Rezeptors 139 mit Disulfidfunktion (2.5 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %). - Nach Zugabe von 100 eq. DET.

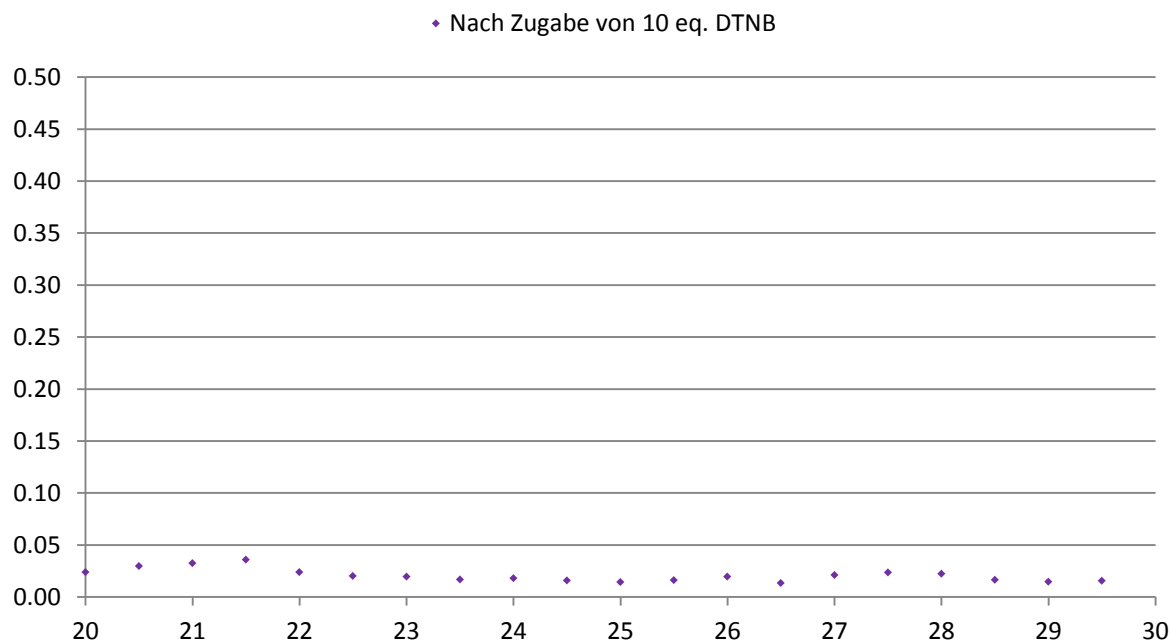


Abbildung 600: Einlagerung des Rezeptors 139 mit Disulfidfunktion (2.5 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %). – Nach Zugabe von 10 eq. DTNB (147).

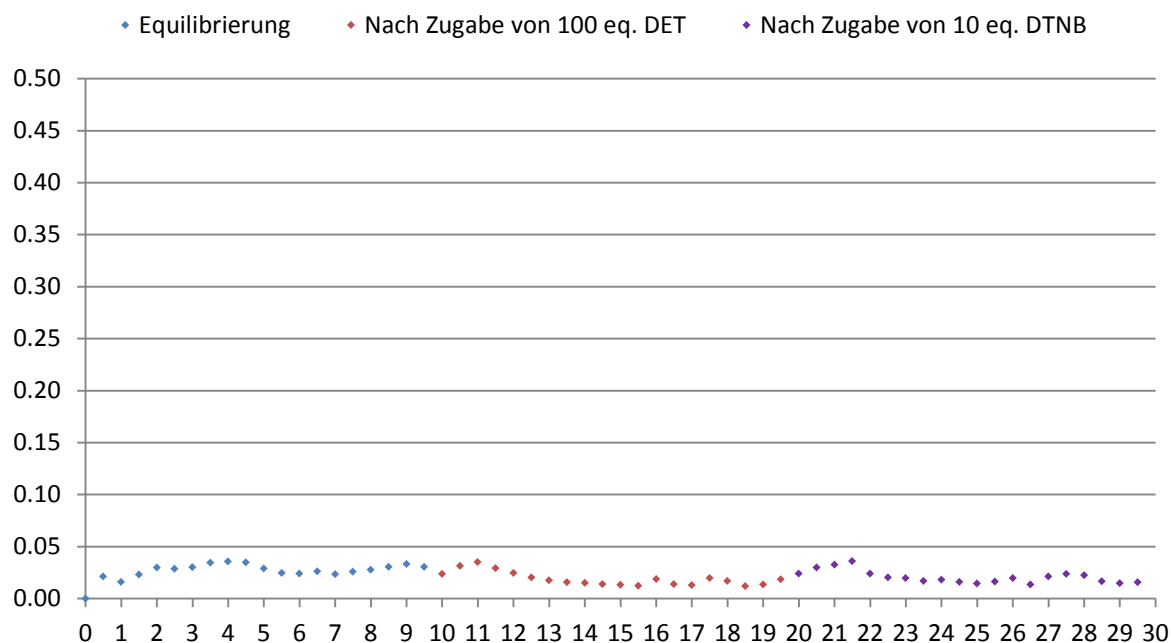


Abbildung 601: Einlagerung des Rezeptors 139 mit Disulfidfunktion (2.5 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %). – Zeitliche Abfolge der Reagenzienzugabe.

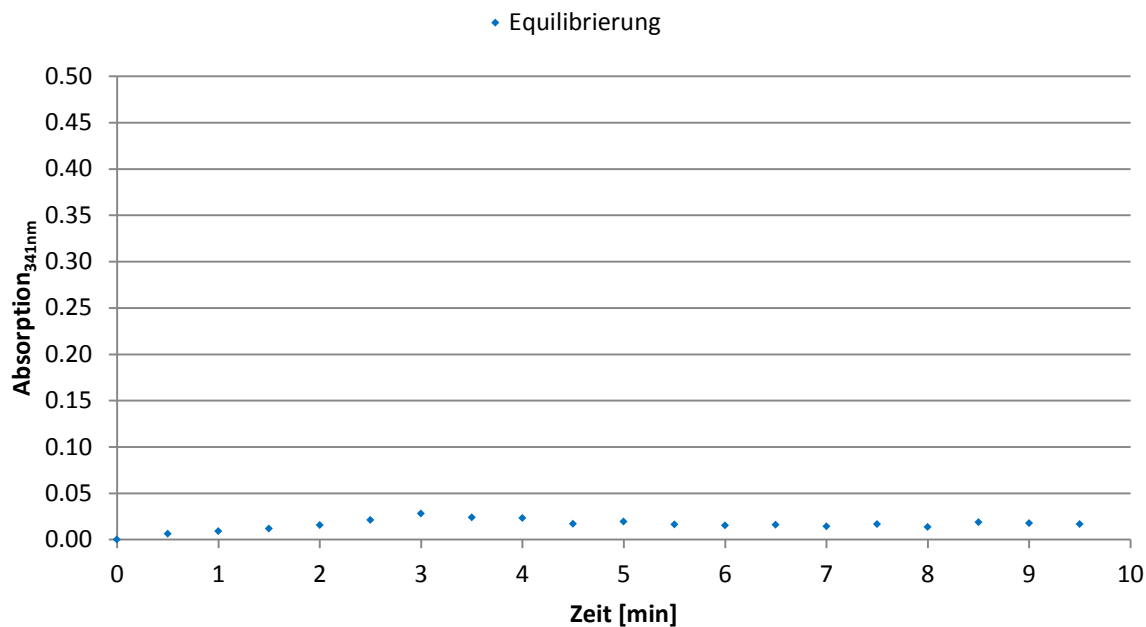
3. Referenzmessungen mit dem Rezeptor 138 mit freier Thiolfunktion nach Methode b)

Abbildung 602: Einlagerung des Rezeptors 138 mit freier Thiolfunktion (2.5 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %) - Equilibrierung.

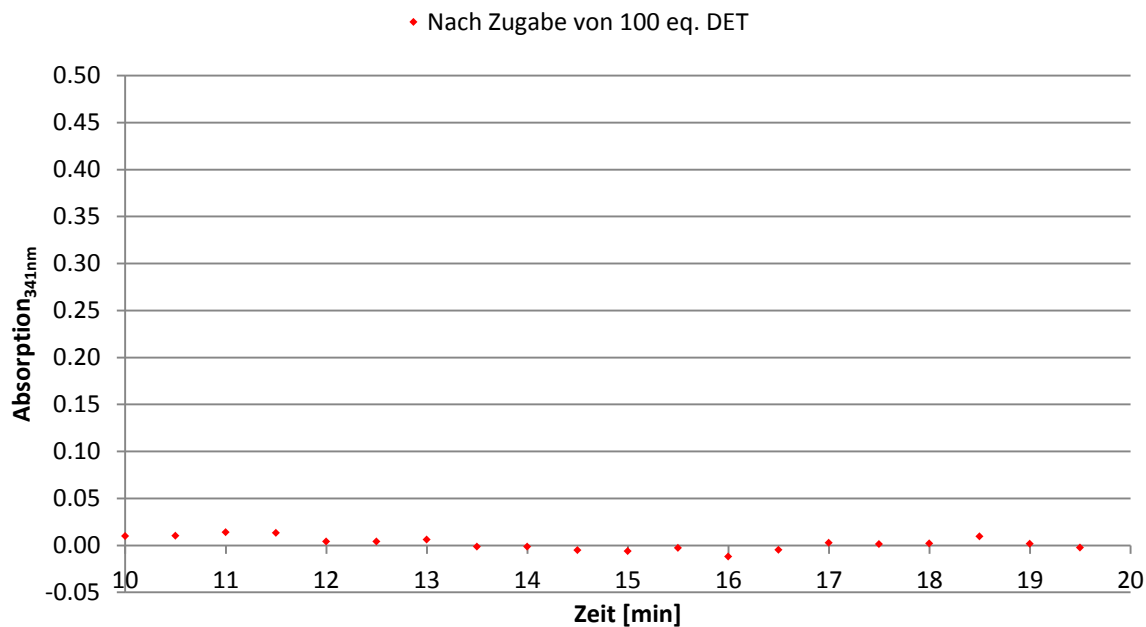


Abbildung 603: Einlagerung des Rezeptors 138 mit freier Thiolfunktion (2.5 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %) - Zugabe von 100 eq. DET.

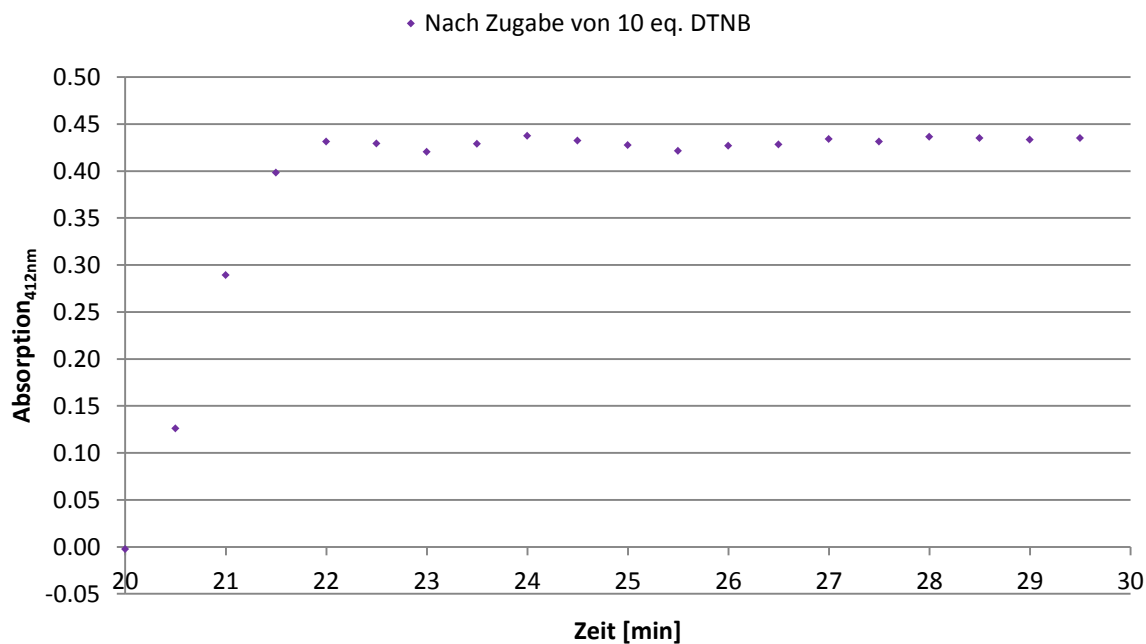


Abbildung 604: Einlagerung des Rezeptors 138 mit freier Thiolfunktion (2.5 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %) – Zugabe von 10 eq. DTNB (147).

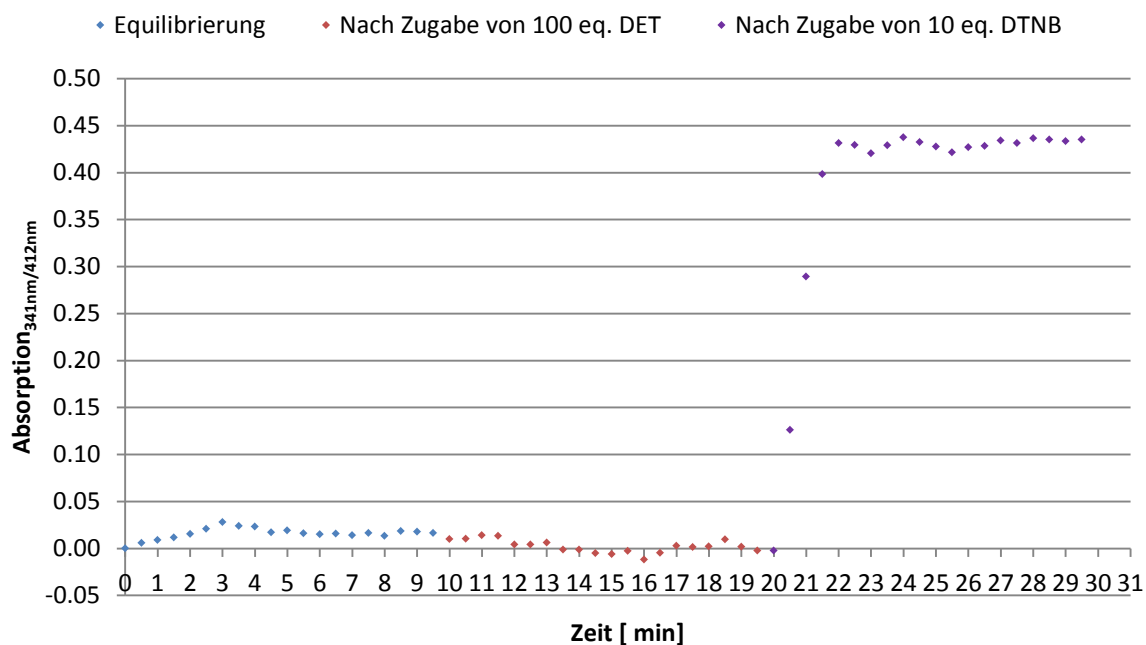


Abbildung 605: Einlagerung des Rezeptors 138 mit freier Thiolfunktion (2.5 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %) – Zeitliche Abfolge der Reagenzienzugabe.

4. Referenzmessungen mit dem Rezeptor 139 mit Disulfidfunktion nach Methode b)

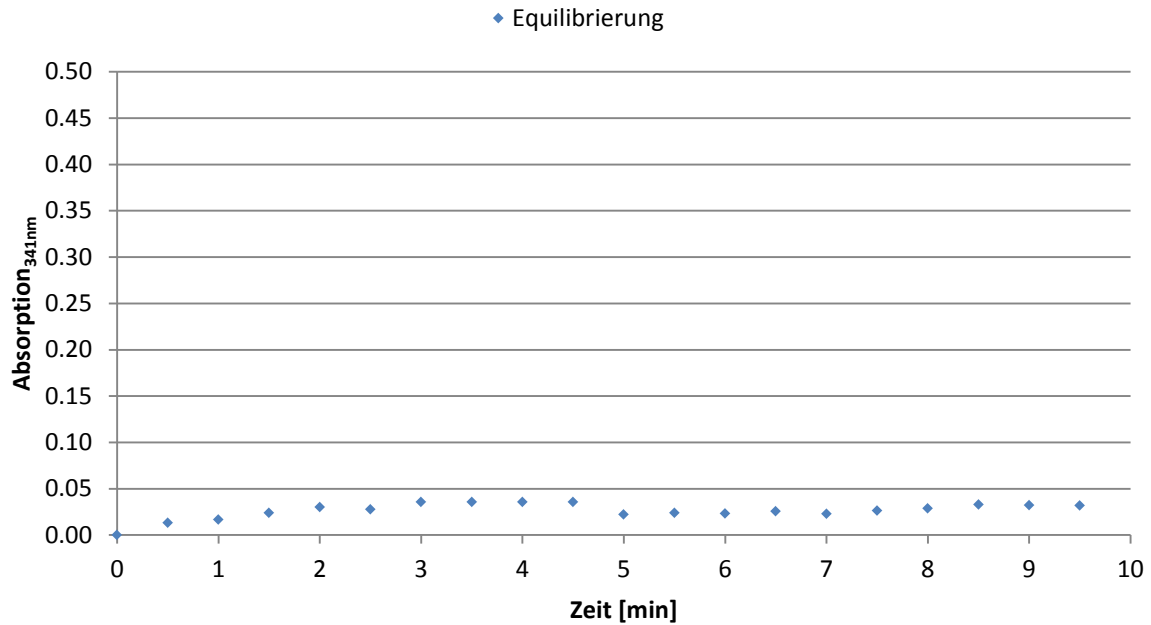


Abbildung 606: Einlagerung des Rezeptors 139 mit Disulfidfunktion (2.5 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %). - Equilibrierung.

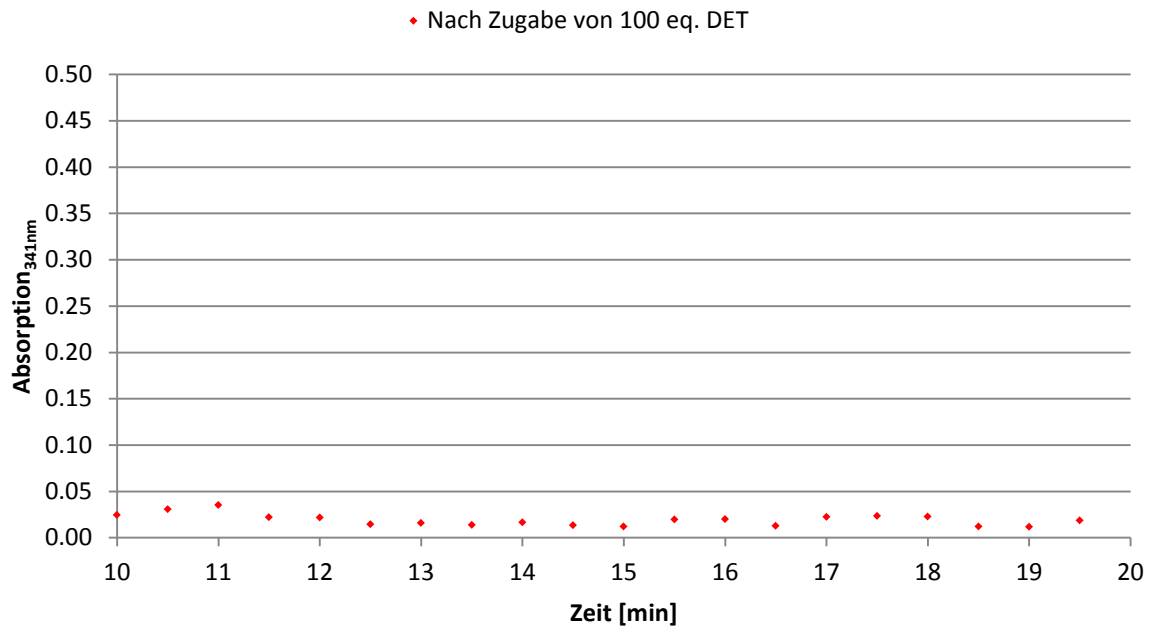


Abbildung 607: Einlagerung des Rezeptors 139 mit Disulfidfunktion (2.5 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %). - Nach Zugabe von 100 eq. DET.

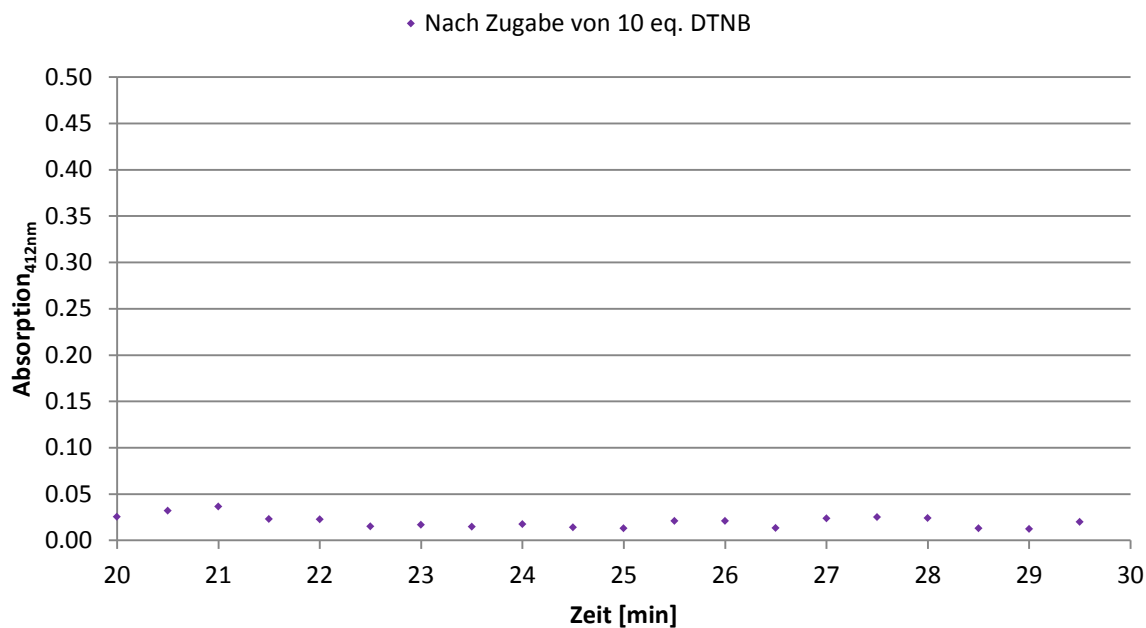


Abbildung 608: Einlagerung des Rezeptors 139 mit Disulfidfunktion (2.5 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %). – Nach Zugabe von 10 eq. DTNB (147).

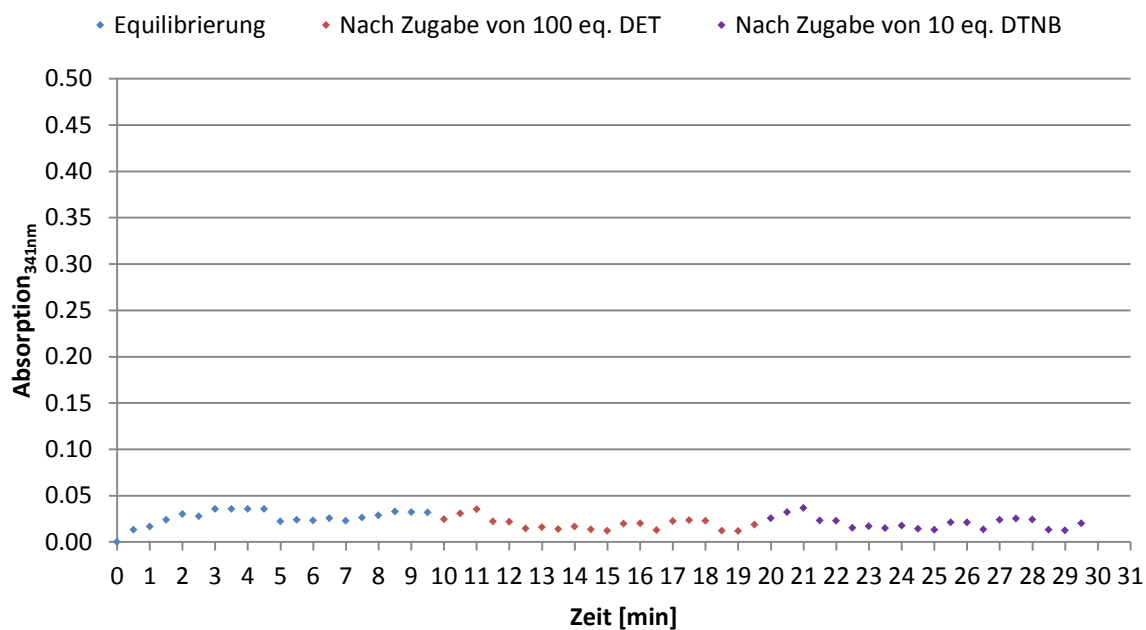


Abbildung 609: Einlagerung des Rezeptors 139 mit Disulfidfunktion (2.5 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %). – Zeitliche Abfolge der Reagenzienzugabe.

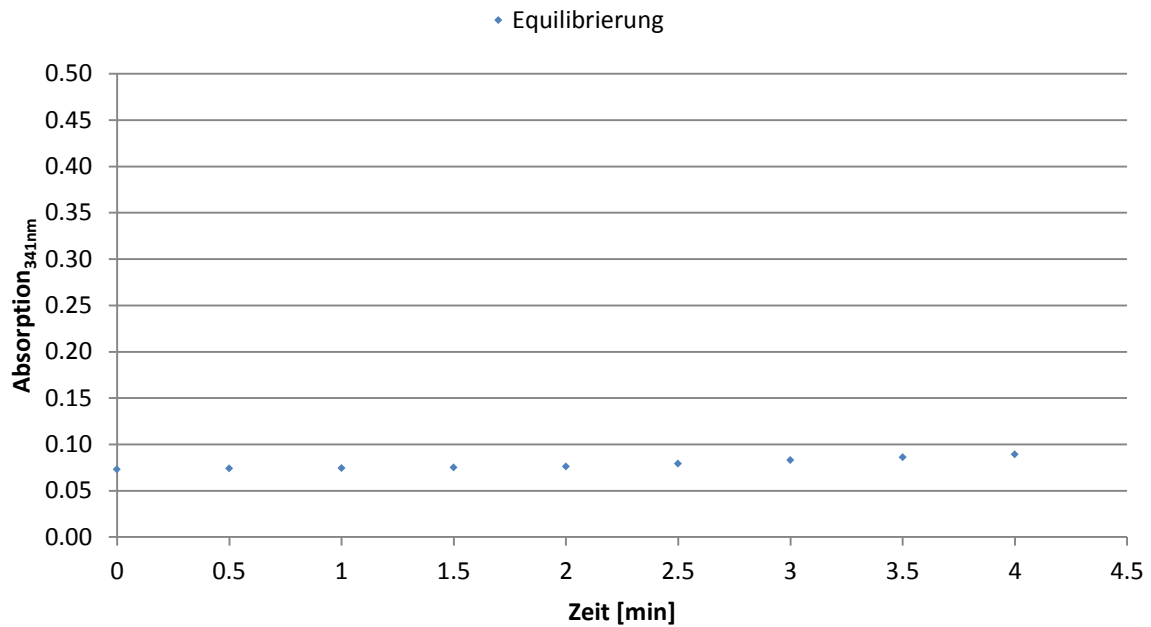
5. Signaltransduktionsexperimente nach Methode a) und b)

Abbildung 610: Einlagerung der Rezeptoren 138 und 139 nach Methode a) (Je 2.5 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %) - Equilibrierung.

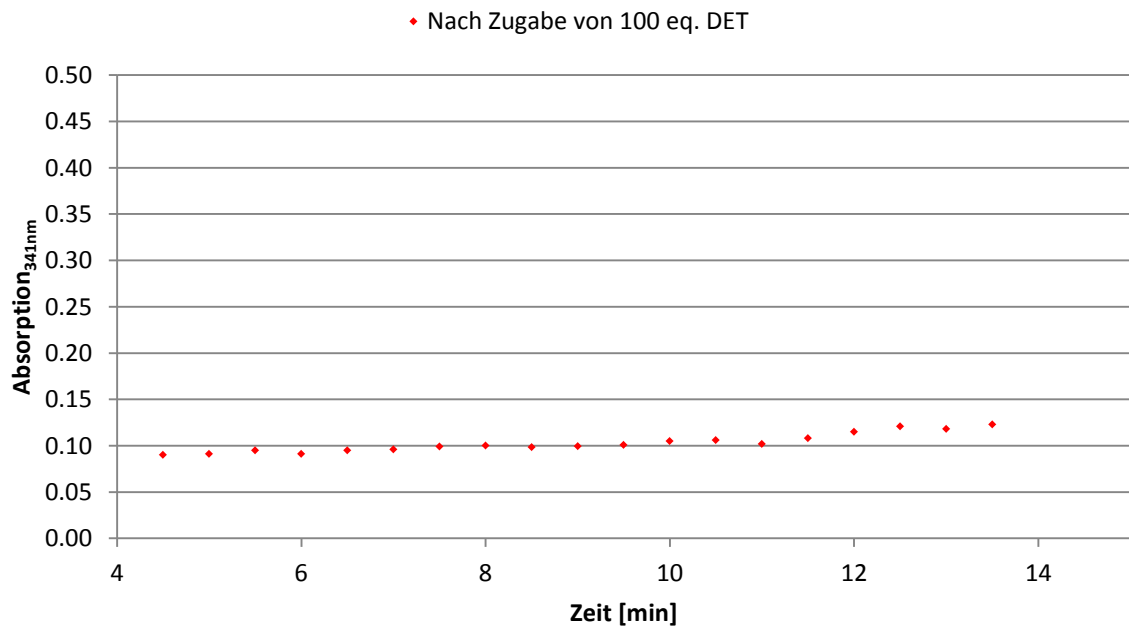


Abbildung 611: Einlagerung der Rezeptoren 138 und 139 nach Methode a) (Je 2.5 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %) - Zugabe von 100 eq. DET.

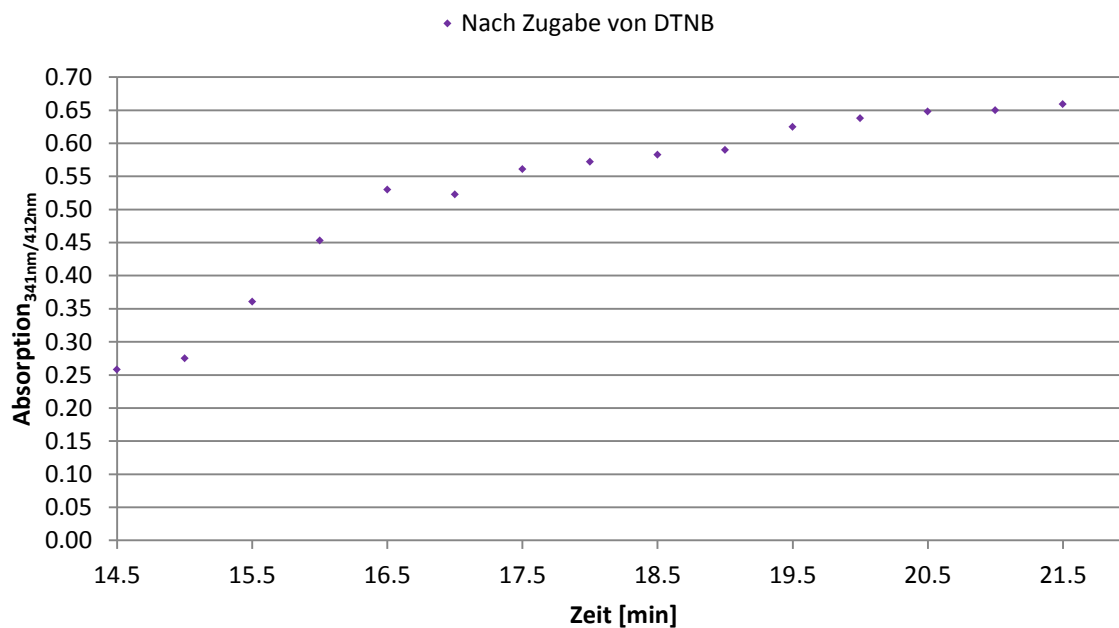


Abbildung 612: Einlagerung der Rezeptoren 138 und 139 nach Methode a) (Je 2.5 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %) - Zugabe von 10 eq. DTNB (147).

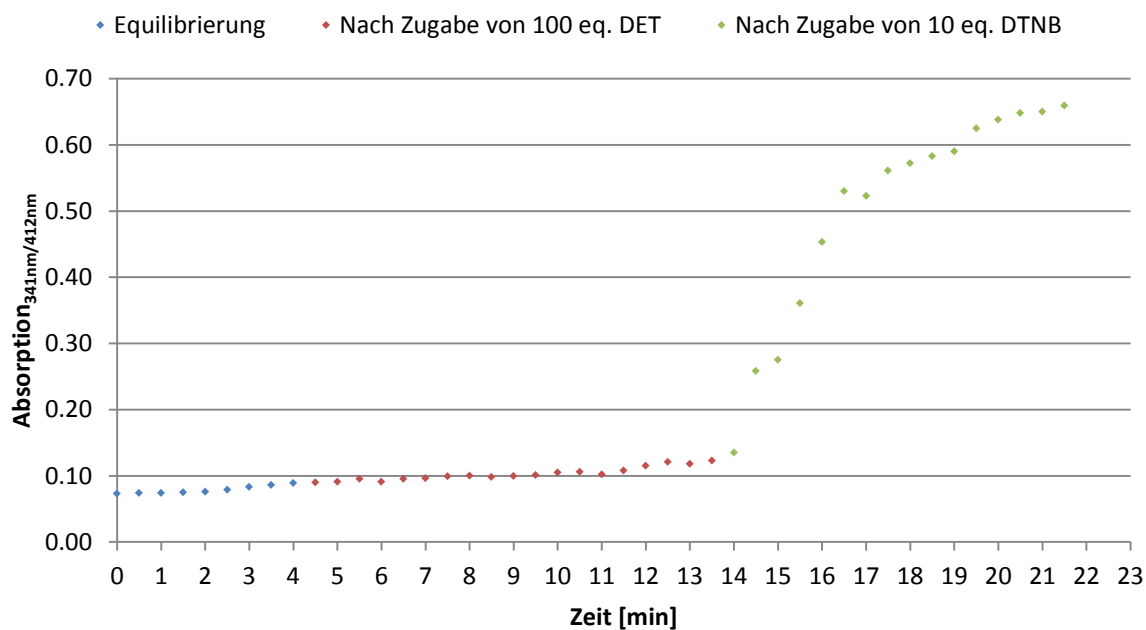


Abbildung 613: Einlagerung der Rezeptoren 138 und 139 nach Methode a) (Je 2.5 % in DMPC/DPPC = 75 %/25 %) - Zeitliche Abfolge der Reagenzienzugabe.

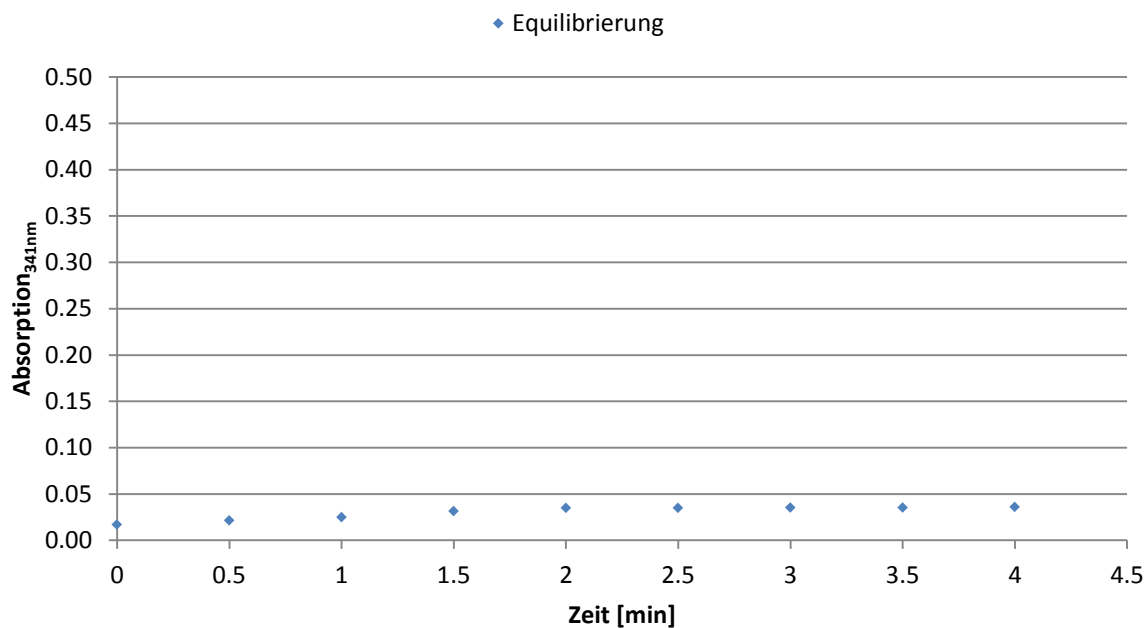


Abbildung 614: Einlagerung der Rezeptoren 138 und 139 nach Methode b) (Je 2.5 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %) - Equilibrierung.

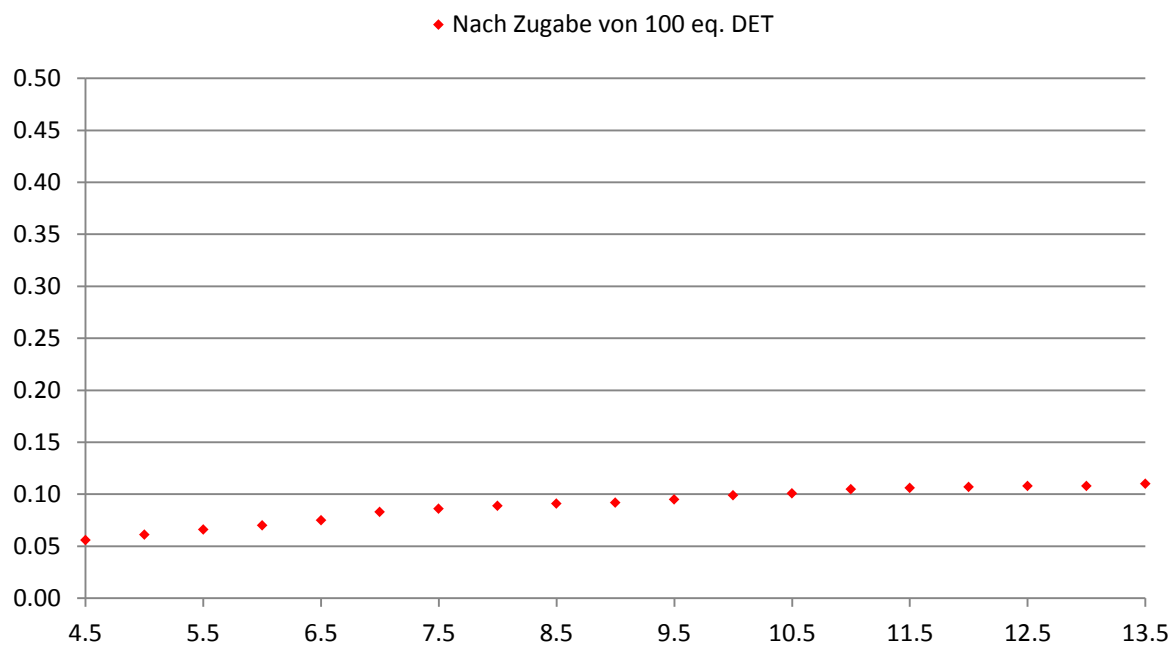


Abbildung 615: Einlagerung der Rezeptoren 138 und 139 nach Methode b) (Je 2.5 % in DMPC/DPPC = 75% - 25%) - Zugabe von 100 eq. DET.

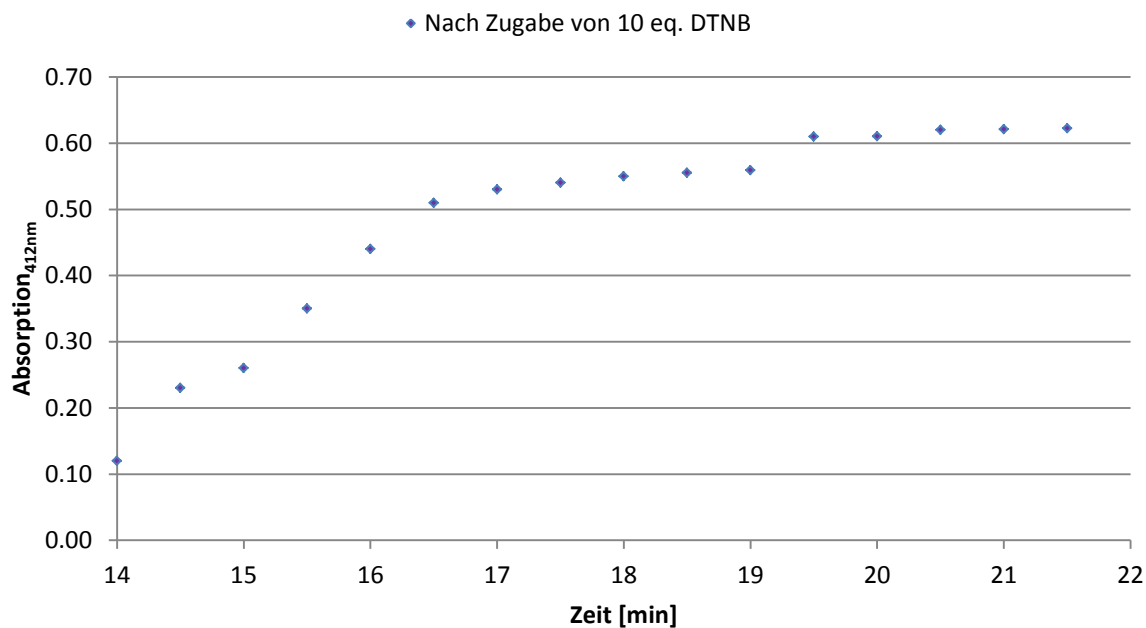


Abbildung 616: Einlagerung der Rezeptoren 138 und 139 nach Methode b) (Je 2.5 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %) - Zugabe von 10 eq. DTNB (147).

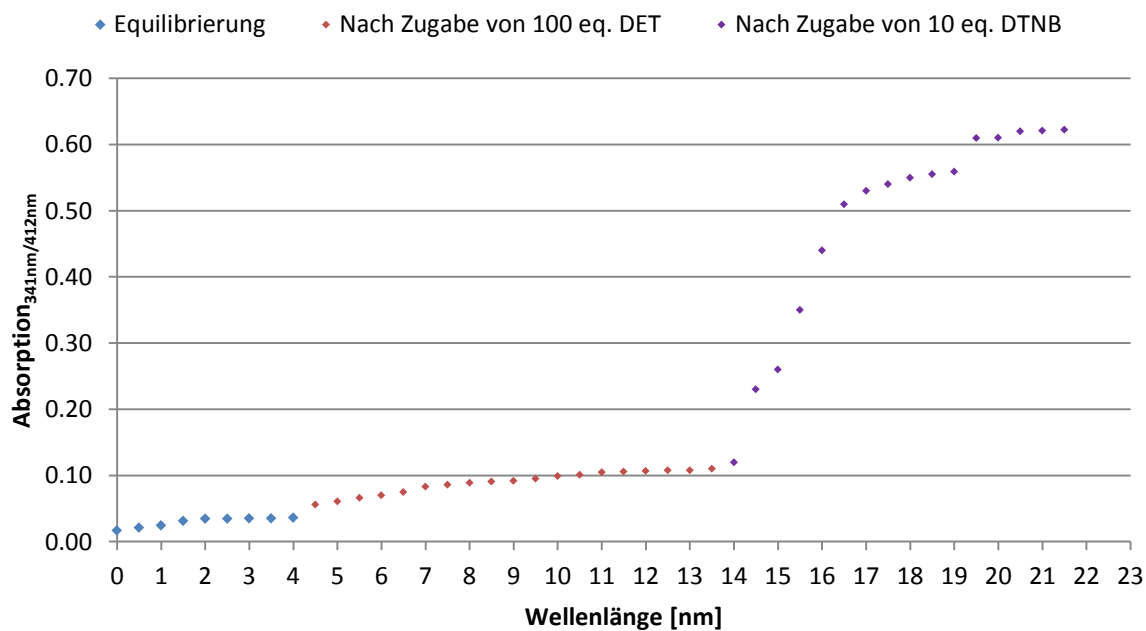


Abbildung 617: Einlagerung der Rezeptoren 138 und 139 nach Methode b) (Je 2.5 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %) - Zeitliche Abfolge der Reagenzienzugabe.

5.7.2 Signaltransduktionsexperimente mit den Rezeptoren 138 und 139, DET als Botenstoff und Triphenylphosphin-3,3,3-trisulfonsäure-trinatriumsalz (146) zur Reduktion extravasikulärer Disulfid-Gruppen

Für die folgenden Experimente wurden die Liposomen nach Methode b) präpariert. Die Absorptionsmessungen und die Abfolge der Zugabe der Reagenzien erfolgte nach folgender Vorschrift: 300 μL der wässrigen Liposomenlösung wurden in eine Microtiterplatte der Marke *Falcon Flat Transparent* überführt und die Lösung über einen Zeitraum von 5-10 min equilibriert und gleichzeitig auf 25 °C temperiert. Als Referenz wurde eine Basislinie (400-650 nm) gegen den verwendeten MES-Puffer mit einem undotiertem Liposom aus einer Lipidmatrix aus DMPC/DPPC = 75 % - 25 % (2 mmol/L) gemessen. Während der Equilibrierung wurde alle 60 sec die Absorption bei 341 nm bestimmt. Nach annähernder Konstanz der Absorption wurden 100 eq. DET zugegeben. Wiederum wurde über einen Zeitraum von 10 min alle 60 s die Absorption bei 341 nm bestimmt. Nach weiteren 10 min wurden 10 eq. des Reduktionsmittels Triphenylphosphin-3,3,3-trisulfonsäure-trinatriumsalz (**146**) zugegeben und über einen Zeitraum von 10 min alle 60 s die Absorption bei 341 nm bestimmt. Nach Zugabe der Reagenzien wurde jeweils ein Übersichtsspektrum gemessen, um eventuell auftretende Trübungserscheinungen durch Zugabe der Reagenzien ausschließen zu können. Das Experiment wurde in analoger Weise mit der umgekehrten Reihenfolge der Reagenzien durchgeführt. Die Referenzmessungen mit den einzelnen Rezeptoren **138** und **139** erfolgten unter den gleichen Bedingungen.

1. Referenzmessungen mit dem Rezeptor **138** mit freier Thiofunktion

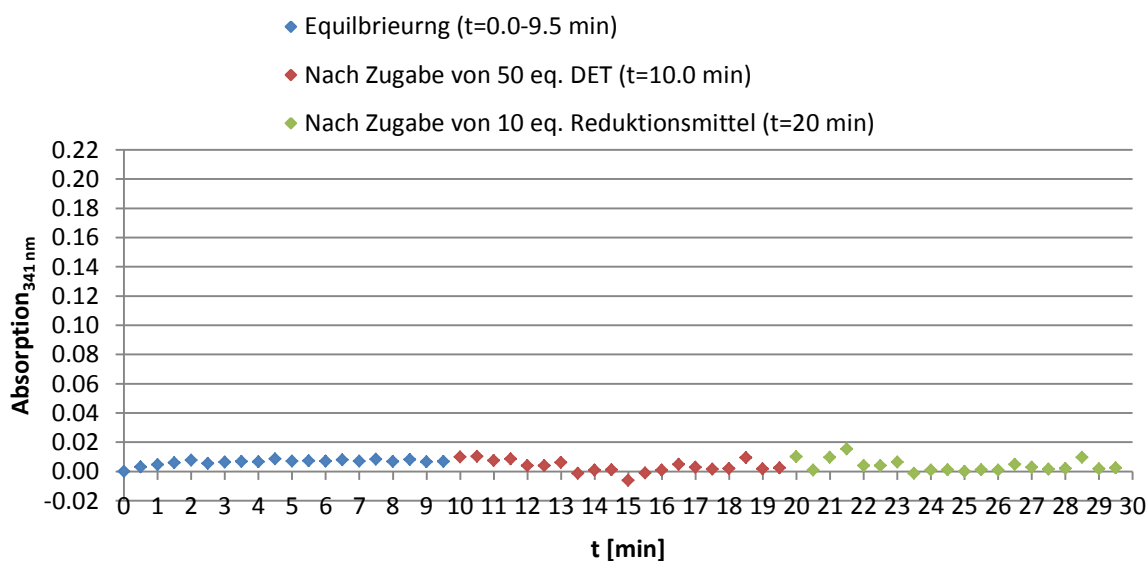


Abbildung 618: Einlagerung des Rezeptors **138** nach Methode b) (2.5 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %) – Zeitliche Abfolge der Reagenzienzugabe (1. Zugabe von 50 eq. DET; 2. Zugabe von 10 eq. Reduktionsmittel (**146**)).

2. Referenzmessungen mit dem Rezeptor **139** mit Disulfidfunktion

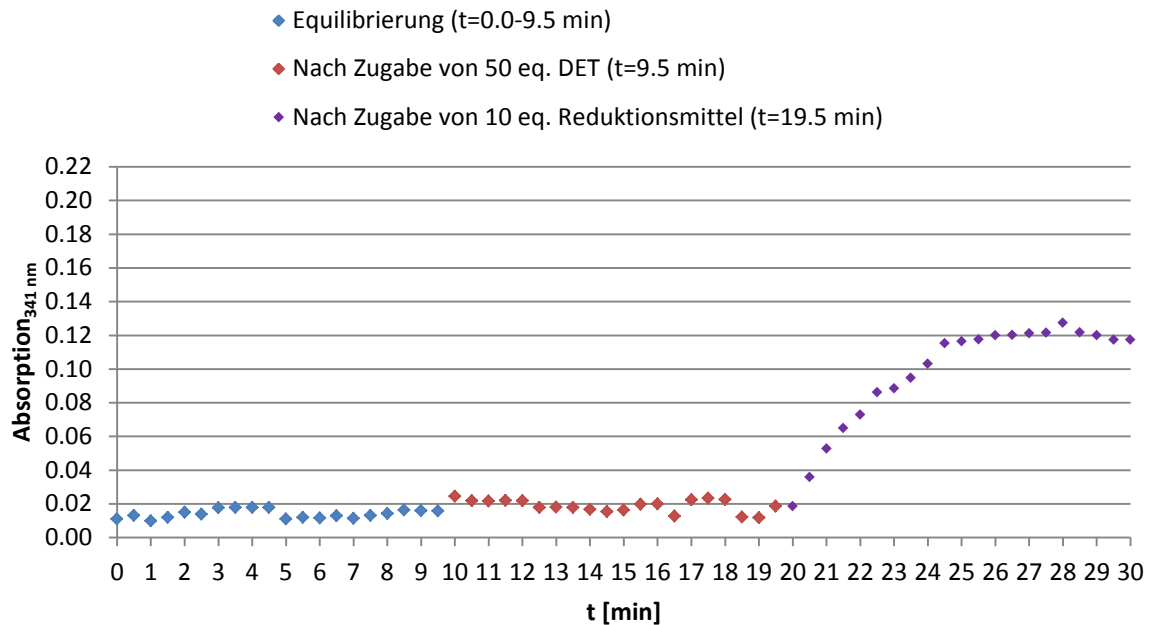


Abbildung 619: Einlagerung des Rezeptors 138 nach Methode b) (2.5 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %) – Zeitliche Abfolge der Reagenzienzugabe (1. Zugabe von 50 eq. DET; 2. Zugabe von 10 eq. Reduktionsmittel (146)).

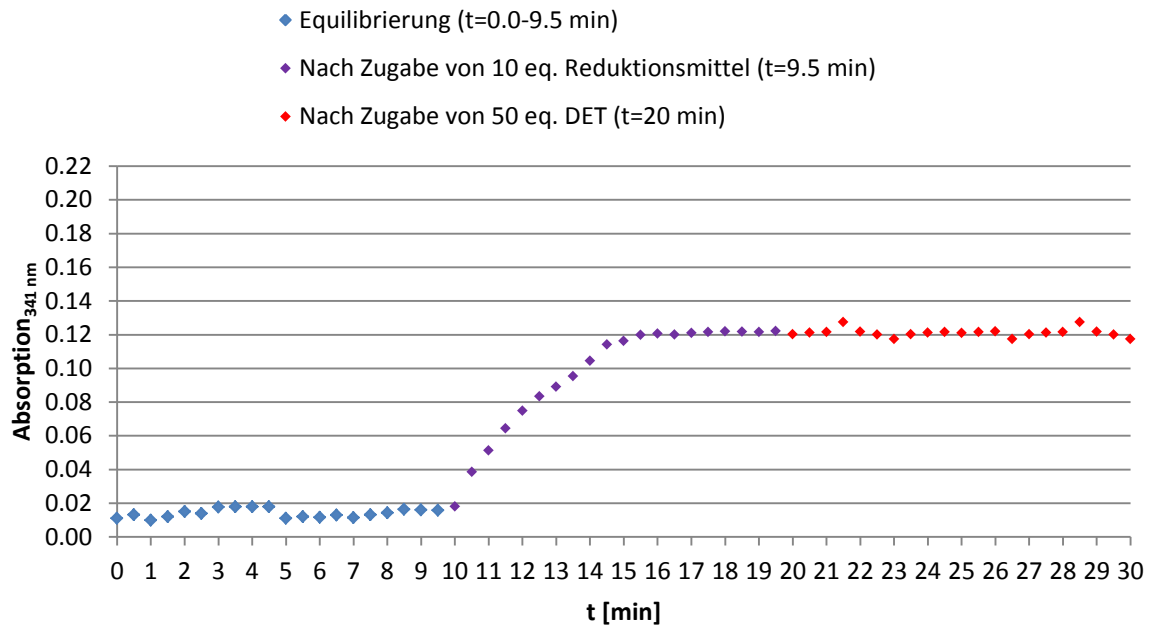


Abbildung 620: Einlagerung des Rezeptors 138 nach Methode b) (2.5 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %) – Zeitliche Abfolge der Reagenzienzugabe (1. Zugabe von 10 eq. Reduktionsmittel (146); 2. Zugabe von 50 eq. DET).

3. Signaltransduktionsexperimente mit den Rezeptoren 138 und 139

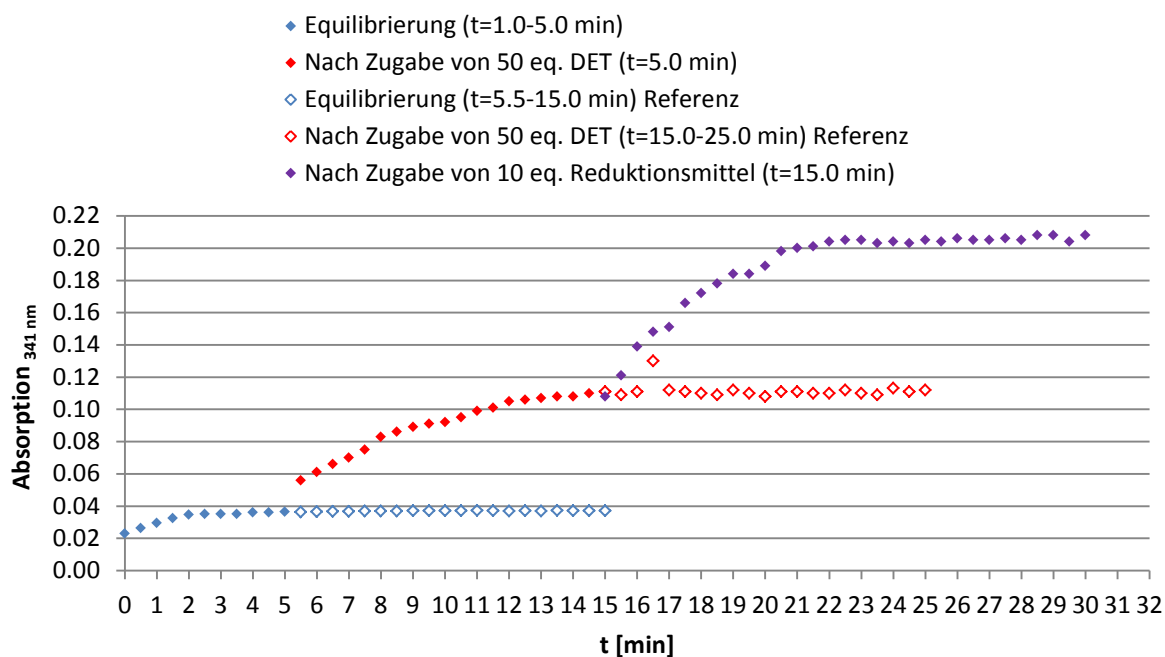


Abbildung 621: Einlagerung der Rezeptoren 138 und 139 nach Methode b) (Je 2.5 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %) - Zeitliche Abfolge der Reagenzienzugabe (1. Zugabe von 50 eq. DET; 2. Zugabe von 10 eq. Reduktionsmittel (146)).

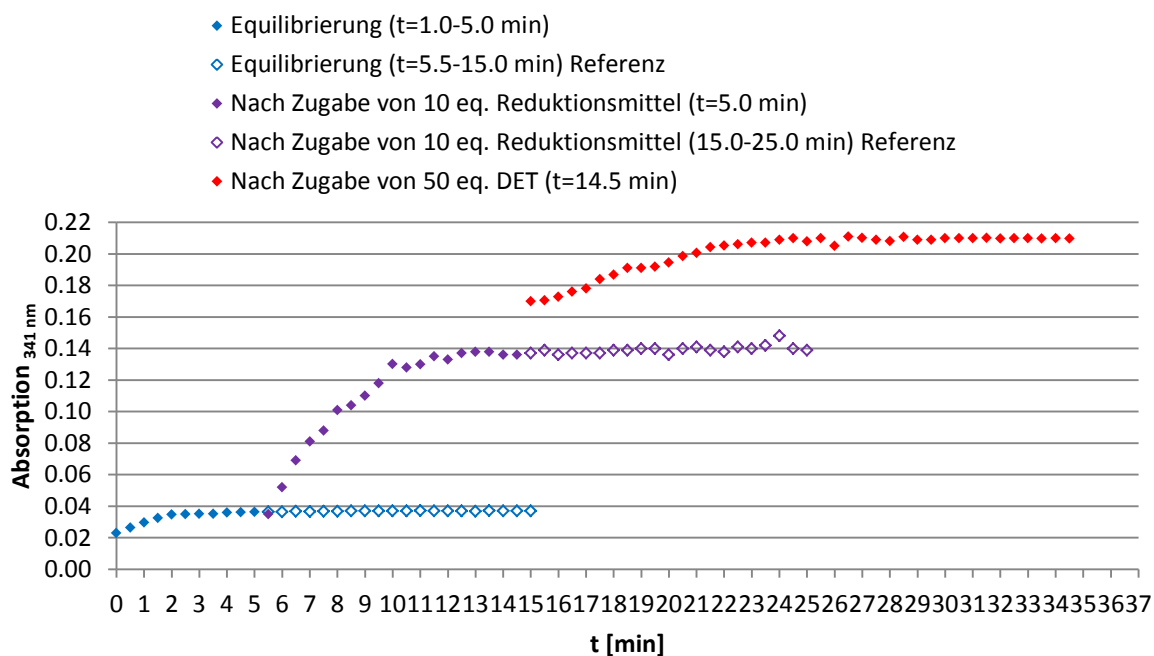


Abbildung 622: Einlagerung der Rezeptoren 138 und 139 nach Methode b) (Je 2.5 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %) - Zeitliche Abfolge der Reagenzienzugabe (1. Zugabe von 10 eq. Reduktionsmittel (146); 2. Zugabe von 50 eq. DET).

5.7.3 Verwendung von Liposomen mit anderer Lipidzusammensetzung für die Rezeptoren 138 und 139

▪ Liposomenpräparation und Absorptionsmessungen

In den folgenden Experimenten wurden die Rezeptoren **138** und **139** in Liposomen, bestehend aus den reinen Lipiden DMPC bzw. DPPC eingelagert, um den Einfluss des Liposomenmaterials auf die Signalleitung mit den Transmembranbausteinen **138** und **139** zu untersuchen. Die Präparation der Liposomen erfolgte nach der unter 5.7.1 b) beschriebenen Methode. Die Absorptionsmessungen wurden analog zur Vorschrift 5.7.2 unter Verwendung von Triphenylphosphin-3,3,3-trisulfonsäure-trinatriumsalz (**146**) zur Detektion der extrazellulären Dissulfidfunktionen durchgeführt.

1. Verwendung von DMPC als Liposomenmaterial

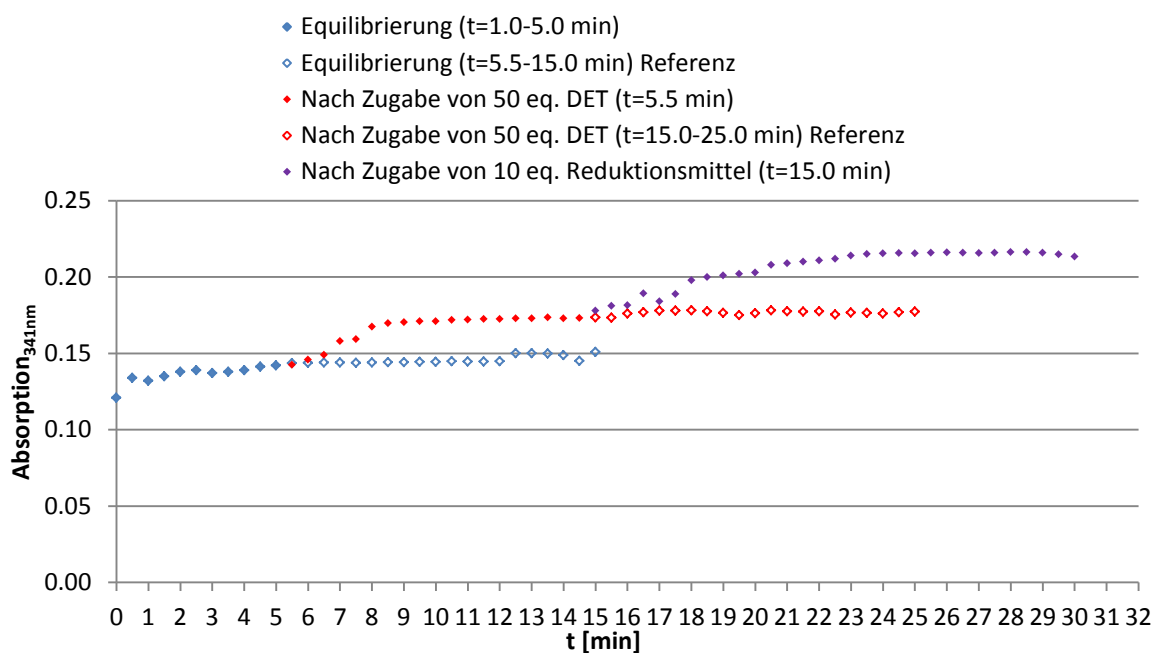


Abbildung 623: Einlagerung der Rezeptoren 138 und 139 nach Methode b) (Je 2.5 % in DMPC) – Zeitliche Abfolge der Reagenzienzugabe (1. Zugabe von 50 eq. DET; 2. Zugabe von 10 eq. Reduktionsmittel (**146**)).

2. Verwendung von DPPC als Liposomenmaterial

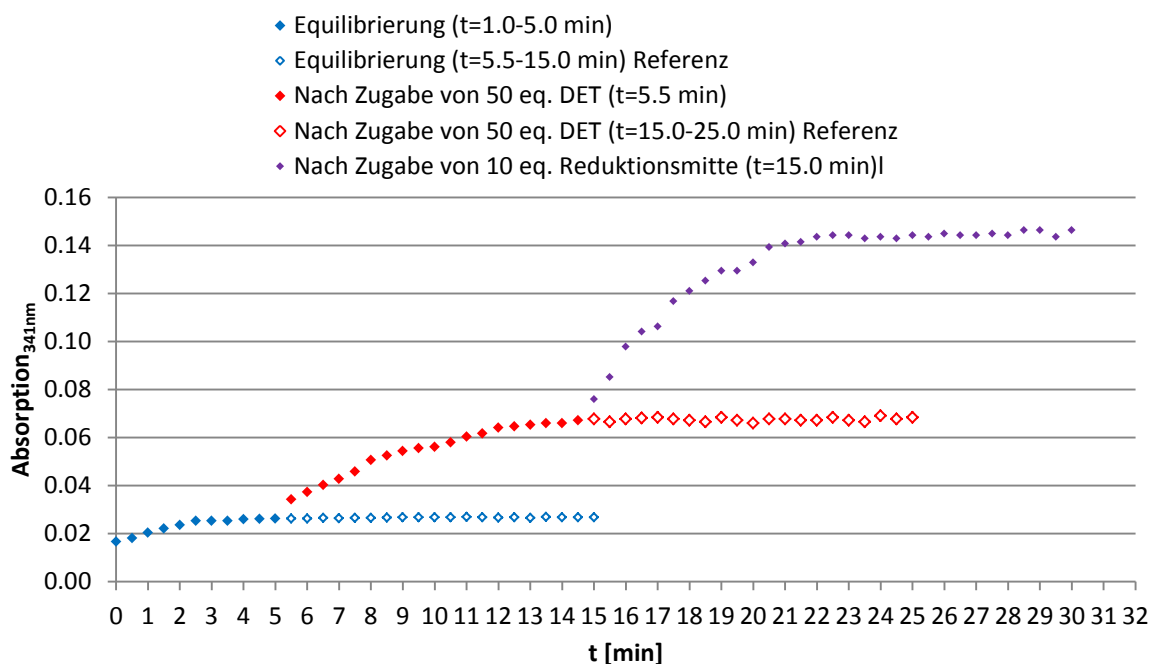


Abbildung 624: Einlagerung der Rezeptoren 138 und 139 nach Methode b) (Je 2.5 % in DPPC) – Zeitliche Abfolge der Reagenzienzugabe (1. Zugabe von 50 eq. DET; 2. Zugabe von 10 eq. Reduktionsmittel (146)).

5.7.4 Verwendung anderer Botenstoffe

▪ Liposomenpräparation und Absorptionsmessungen

Für die folgenden Experimente wurden die Liposomen nach Methode b) präpariert. Die Absorptionsmessungen und die Abfolge der Zugabe der Reagenzien erfolgte nach folgender Vorschrift: 300 µL der wässrigen Liposomenlösung wurden in eine Microtiterplatte der Marke *Falcon Flat Transparent* überführt und die Lösung über einen Zeitraum von 5-10 min equilibriert und gleichzeitig auf 25 °C temperiert. Als Referenz wurde eine Basislinie (400-650 nm) gegen den verwendeten MES-Puffer mit einem undotiertem Liposom aus einer Lipidmatrix aus DMPC/DPPC = 75 % - 25 % (2 mmol/L) gemessen. Während der Equilibrierung wurde alle 60 sec die Absorption bei 341 nm bestimmt. Nach annähernder Konstanz der Absorption wurden entweder 50 eq. DET, 50 eq. EDA (**113**), 50 eq. TREN (**114**), 50 eq. Spermidin (**115**) oder 50 eq. Diarginin (**118**) zugegeben. Wiederum wurde über einen Zeitraum von 10 min alle 60 s die Absorption bei 341 nm bestimmt. Nach weiteren 10 min wurden 10 eq. des Reduktionsmittels Triphenylphosphin-3,3,3-trisulfonsäuretrinitriumsalz (**146**) zugegeben und über einen Zeitraum von 10 min alle 60 s die Absorption bei 341 nm bestimmt. Nach Zugabe der Reagenzien wurde jeweils ein Übersichtsspektrum gemessen, um eventuell auftretende Trübungserscheinungen durch Zugabe der Reagenzien ausschließen zu können.

1. Verwendung von Spermidin (115) als Botenstoff

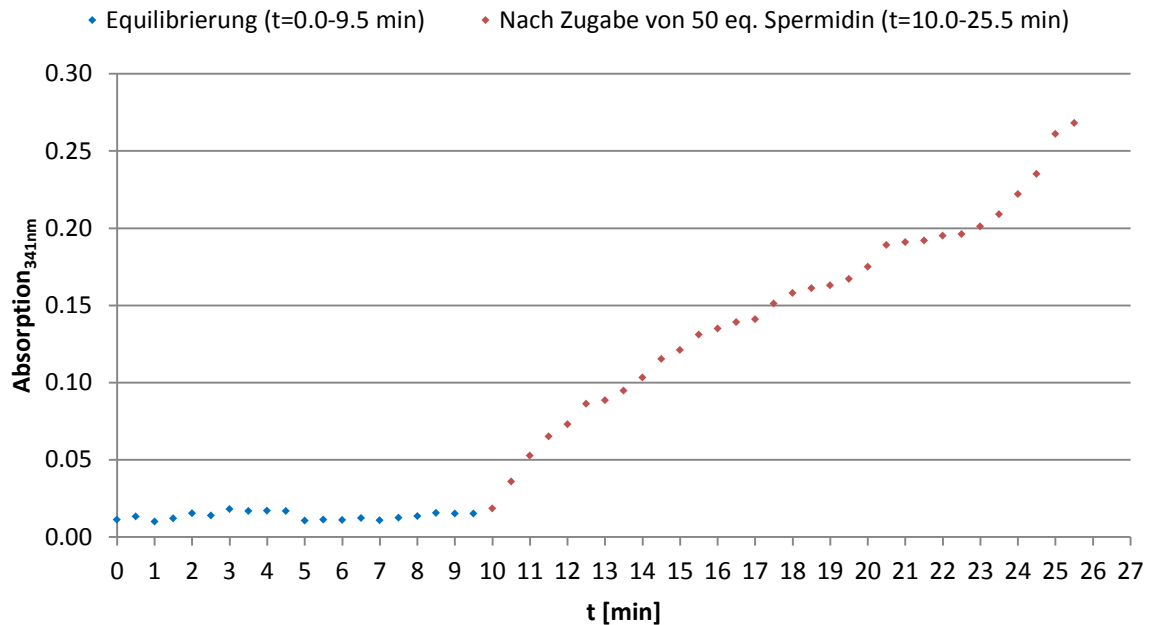


Abbildung 625: Einlagerung der Rezeptoren 138 und 139 nach Methode b) (Je 2.5 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %) – Zeitliche Abfolge der Reagenzienzugabe (1. Zugabe von 50 eq. Spermidin (115); 2. Zugabe von 10 eq. Reduktionsmittel (146)).

2. Verwendung von Diarginin (118) als Botenstoff

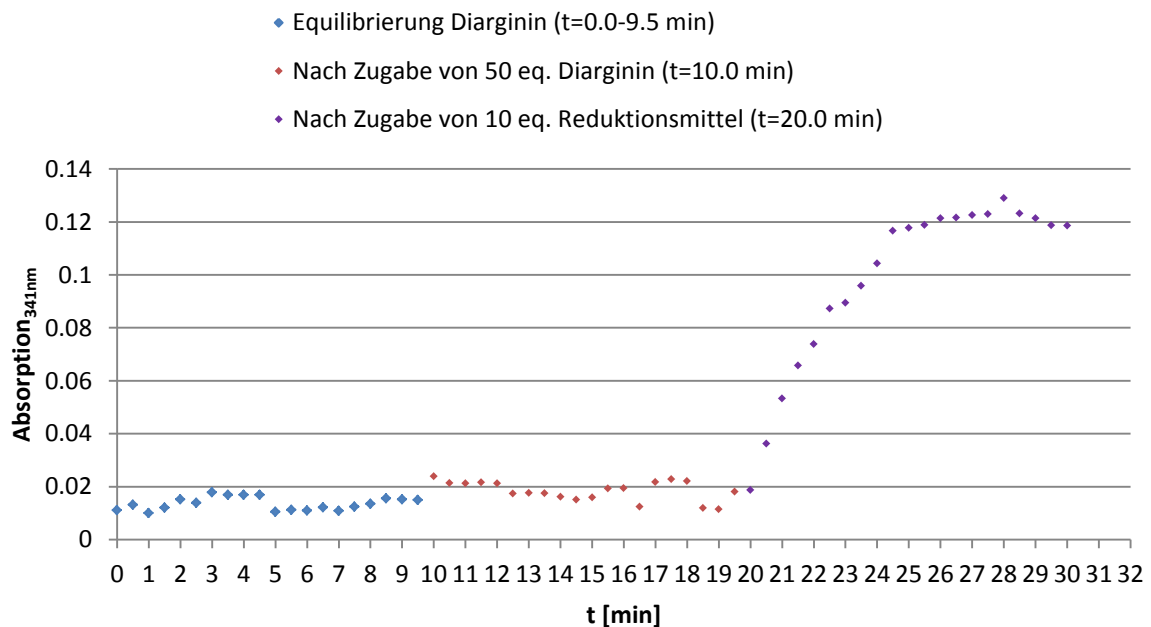


Abbildung 626: Einlagerung der Rezeptoren 138 und 139 nach Methode b) (Je 2.5 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %) – Zeitliche Abfolge der Reagenzienzugabe (1. Zugabe von 50 eq. Diarginin (118); 2. Zugabe von 10 eq. Reduktionsmittel (146)).

3. Verwendung von DET, EDA (113) und TREN (114) als Botenstoffe

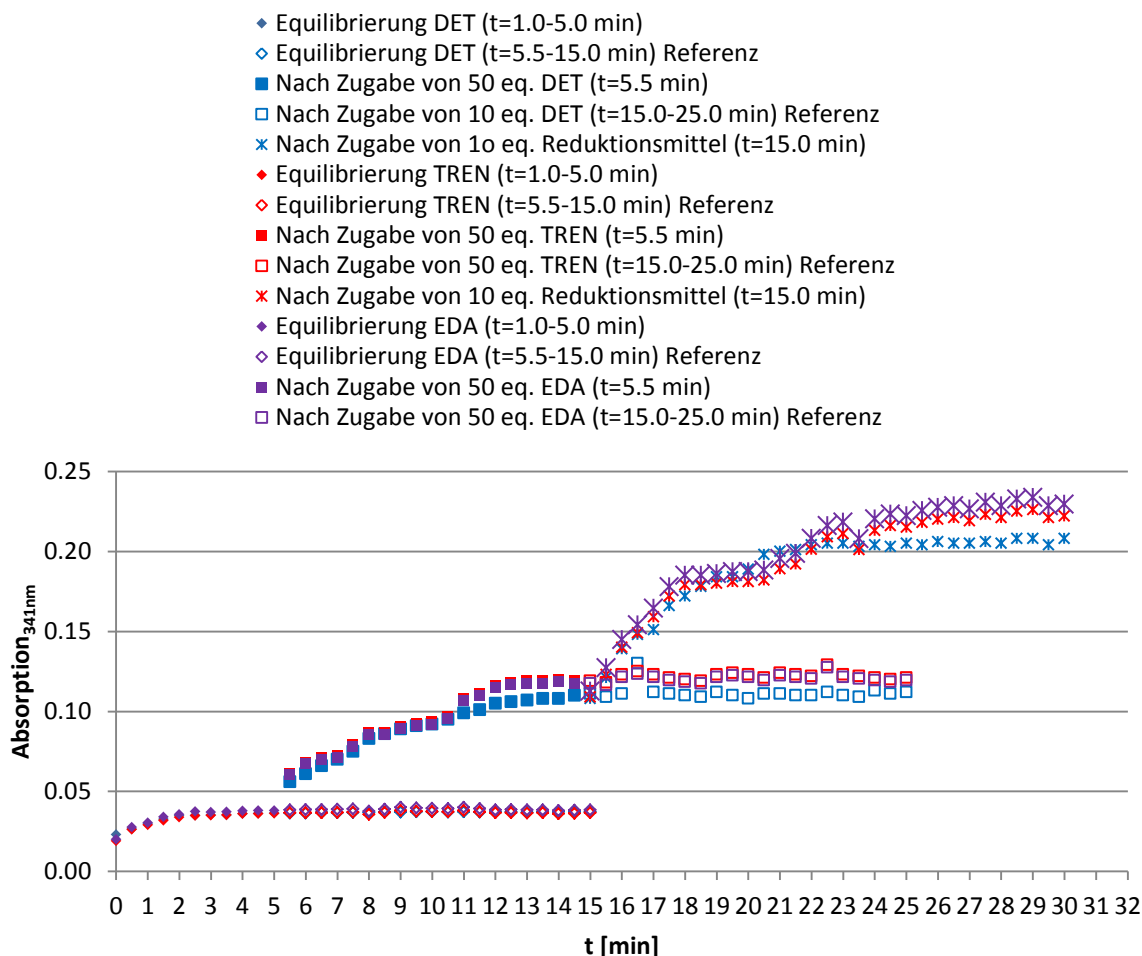


Abbildung 627: Einlagerung der Rezeptoren 138 und 139 nach Methode b) (Je 2.5 % in DMPC/DPPC = 75 % - 25 %) - Zeitliche Abfolge der Reagenzienzugabe (1. Zugabe von 50 eq. DET/EDA/TREN; 2. Zugabe von 10 eq. Reduktionsmittel (146)).

5.7.5 Ausschluss einer interzellulären Reaktion der Rezeptoren 138 und 139

▪ Liposomenpräparation

Für die folgenden Experimente wurden zwei getrennte Liposomenlösungen (a) und (b) mit einer Dotierung von 2.5 % der Transmembranbausteine **138** (a) bzw. **139** (b) in einer Lipidmatrix aus DMPC/DPPC = 75 % - 25 % verwendet. Entsprechend der Tabelle 3 und Tabelle 4 wurden je 500 µL der Transmembranbausteinlösungen ($c = 10^{-4}$ mol/L) **138** bzw. **139** mit jeweils 750 µL der DMPC-Stammlösung ($c = 2$ mmol/L) und jeweils 250 µL DPPC-Stammlösung ($c = 2$ mmol/L) versetzt. Die Gemische wurden am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingedunstet und anschließend für min. 3 h gefriergetrocknet. Die resultierenden Filme wurden in je 1000 µL MES-Puffer (375 mmol, pH = 5.5) aufgenommen und für min. 1 min gevortext. Anschließend wurden die Liposomenlösungen zur Herstellung unilamella-

rer Liposomen min. 19-mal (ungerade Anzahl an Extrusionszyklen) durch eine 200 nm Polycarbonatmembran extrudiert (Details: siehe 5.4).

▪ Absorptionsmessungen

Jeweils 150 μL der wässrigen Liposomenlösungen wurden in eine Microtiterplatte der Marke *Falcon Flat Transparent* überführt und die Lösung über einen Zeitraum von min. 5 min equilibriert und gleichzeitig auf 25 °C temperiert. Als Referenz wurde eine Basislinie (400-650 nm) gegen den verwendeten MES-Puffer mit einem undotiertem Liposom aus einer Lipidmatrix aus DMPC/DPPC = 75 % - 25 % (2 mmol/L) gemessen. Während der Equilibrierung wurde alle 60 sec die Absorption bei 341 nm bestimmt. Nach annähernder Konstanz der Absorption wurden 50 eq. DET zugegeben. Wiederum wurde über einen Zeitraum von 10 min alle 60 s die Absorption bei 341 nm bestimmt. Nach weiteren 10 min wurden 10 eq. des Reduktionsmittels Triphenylphosphin-3,3,3-trisulfonsäure-trinatriumsalz (**146**) zugegeben und über einen Zeitraum von 10 min alle 60 s die Absorption bei 341 nm bestimmt. Nach Zugabe der Reagenzien wurde jeweils ein Übersichtsspektrum gemessen, um eventuell auftretende Trübungerscheinungen durch Zugabe der Reagenzien ausschließen zu können.

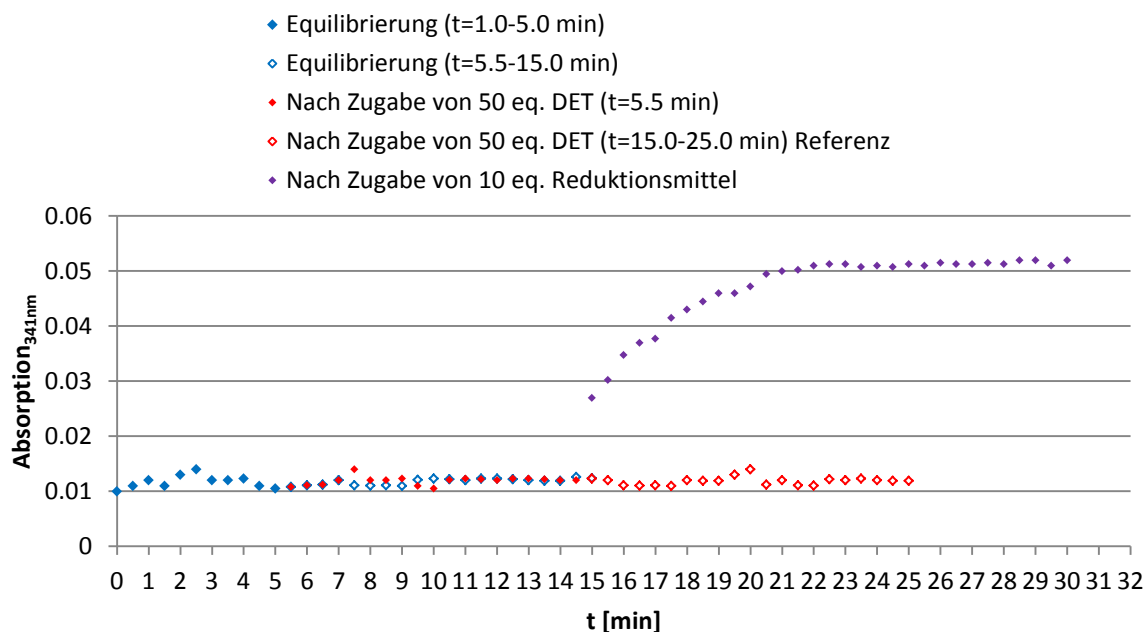


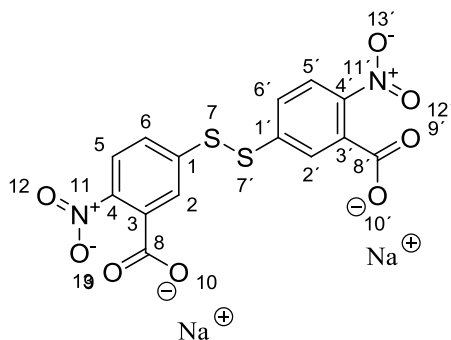
Abbildung 628: Ausschluss einer interzellulären Reaktion der Rezeptoren 138 und 139 in DMPC/DPPC = 75 % -25 %.

5.8 Photolyseexperimente mit den Bausteinen 172 und 173

5.8.1 Ellman Assay^[257]

Der Ellman-Assay wird zur Konzentrationsbestimmung von freien Thiolfunktionen in wässriger Lösung verwendet. Hierbei reagieren die freien Thiolfunktionen, der in Lösung vorhanden Substrate mit DTNB (5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure) (**147**) unter Abspaltung eines UV-aktiven 2-Nitro-4-thio-benzoesäure-Derivats. Die Konzentration an freien Thiolfunktion kann aus den Absorptionsspektren der Reaktionslösungen ermittelt werden. Zur Etablierung des Ellman-Assays im Mikrotiterplattenmaßstab und zur Erstellung einer Kalibrierungsfunktion wurden, unter Verwendung der Modellsubstanz *N*-Ac-cystein-OH und DTNB-Dinatriumsalz (**147**) in gepufferter Lösung, Absorptionsspektren bei steigenden Konzentrationen an reaktiven Thiolfunktionen aufgenommen.

- **Präparation des wasserlöslichen Ellman-Reagenzes (**147**)**



Durchführung:

1 g DTNB (**147**) (2.523 mmol, 1 eq) wurde mit 0.425 g festem NaHCO_3 , gelöst in 15 mL entionisiertem Wasser, versetzt. Das Gemisch wurde bis zur vollständigen Auflösung des DTNB (**147**) bei RT gerührt. Danach wurden 140 mL 2-Propanol zugegeben und das Gemisch 12 h bei 0 °C im Kühlschrank aufbewahrt. Die leicht gelben Kristalle des DTNB-Natriumsalzes (**147**) wurden durch Filtration abgetrennt und im Ölpumpenvakuum getrocknet. Zur weiteren Verwendung wurde eine Stammlösung des DTNB-Natriumsalzes (**147**) (10 mg, 22.71 mmol) in 10 mL PBS-Puffer (0.137 M NaCl, 0.0027 M KCl, 0.05 M Phosphat) hergestellt. Diese Stammlösung ist für mehrere Tage bei -18°C stabil.

Analytik:

Ausbeute: 99 %. **$^1\text{H-NMR}$** (300 MHz, $\text{MeOD-}d_4$): $\delta = 7.59$ (dd, $^3J_{HH} = 8.60$ Hz, $^4J_{HH} = 2.15$ Hz, 2H, H-6, H-6'), 7.67 (d, $^4J_{HH} = 2.15$ Hz, 2H, H-2, H-2'), 7.92 (d, $^3J_{HH} = 8.60$ Hz, 2H, H-5, H-5'). **$^{13}\text{C-NMR}$** (75.4 MHz, $\text{MeOD-}d_4$): $\delta = 126.2$ (C5, C5'), 127.1 (C2, C2'), 127.4 (C6, C6'), 139.9 (C1, C1'), 144.1 (C3, C3'), 146.9 (C4, C4'), 172.1 (C8, C8'). **IR** (ATR): $\tilde{\nu} = 3402$ (bw), 1599 (s), 1562 (m), 1515 (s), 1464 (m), 1392 (m), 1314 (s), 1306 (s), 1265 (m), 1150 (m), 1103 (m), 1055 (m), 951 (w), 879 (m), 846 (s), 822 (s), 798 (s), 761 (s), 735 (s), 697 (m), 659 (m). **HRMS** (ESI pos., MeOH): ber. für $\text{C}_{14}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_8\text{S}_2\text{Na}$: m/z 418.9614, gef.: m/z 418.9605; (ESI neg., MeOH): ber. für $\text{C}_{14}\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_8\text{S}_2$: m/z 197.3514, gef.: m/z 197.3497.

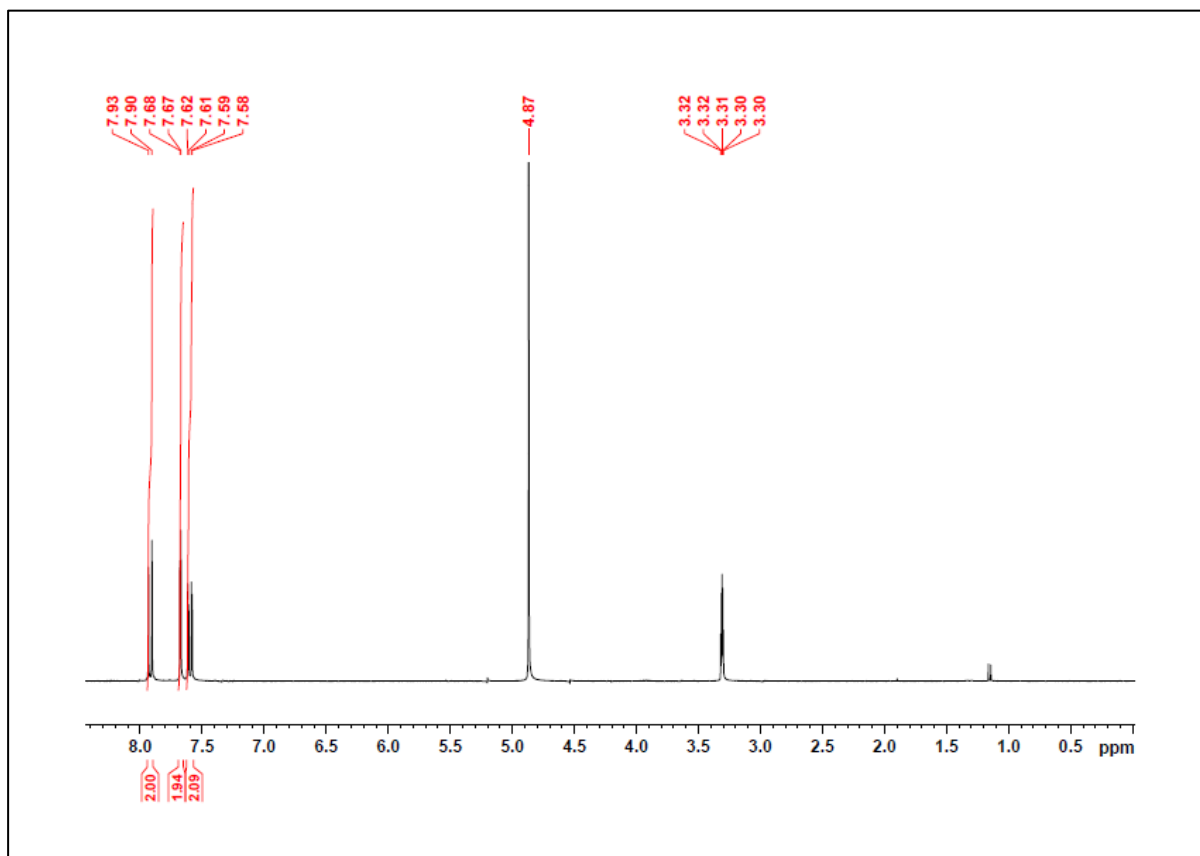


Abbildung 629: $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{MeOD-}d_4$): 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure)-Dinatriumsalz (147).

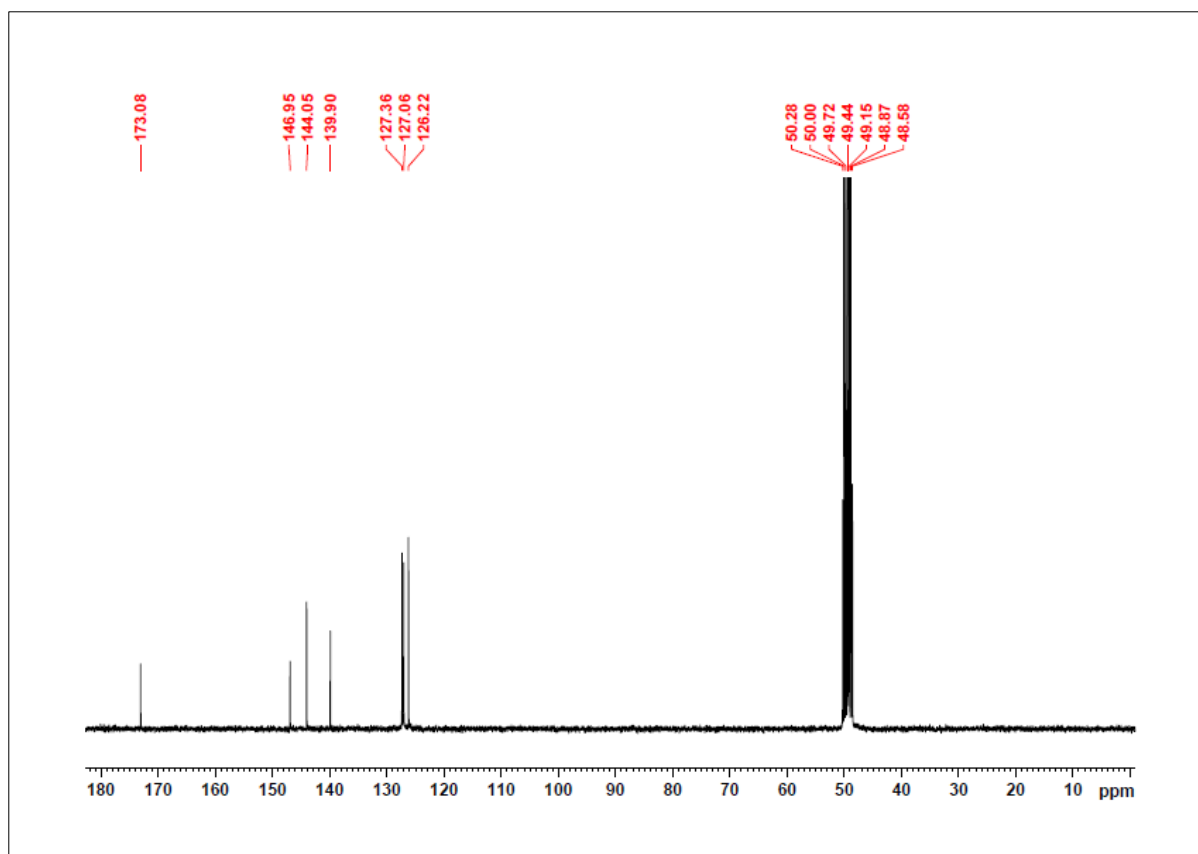


Abbildung 630: ^{13}C -NMR (75.4 MHz, $\text{MeOD-}d_4$): 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure)-Dinatriumsalz (**147**).

▪ Präparation der Stammlösungen von Ac-Cys-OH

Zur Präparation 10^{-4} und 10^{-5} molarer Stammlösungen der Modellverbindung **172** wurden 18.843 mg (1.154×10^{-4} mol) *N*-Ac-cystein-OH in je 11.541 mL Photolysepuffer **2** ($\text{MeCN/PBS} = 1:1$, $\text{pH} = 6.0$) und 17.732 mg (1.061×10^{-4} mol) *N*-Ac-cystein-OH in 10.865 mL Photolysepuffer **4** ($\text{MeCN/MES} = 1:1$, $\text{pH} = 5.5$) gelöst. Aus diesen 10^{-2} molaren Lösungen wurden über eine Verdünnungsreihe die je 10^{-4} und 10^{-5} molaren Stammlösungen erhalten. Die Stammlösungen wurden bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

▪ Ellman-Assay im Mikrotiterplattenmaßstab

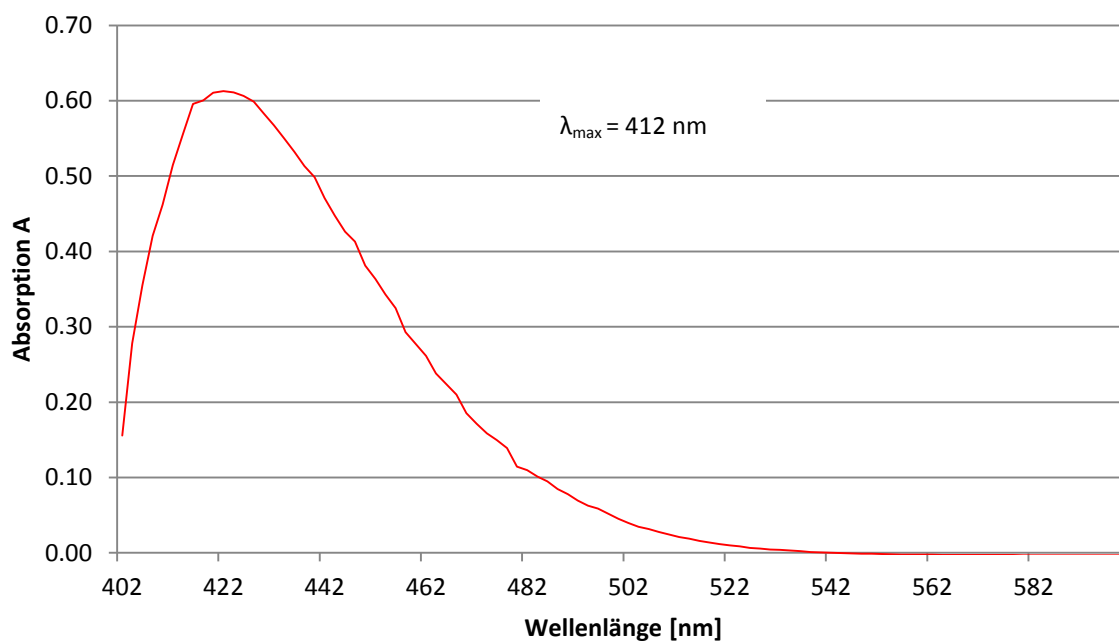
Für die Absorptionsmessungen wurden Proben von Ac-Cys-OH unterschiedlicher Konzentration (10^{-5} - 10^{-4} mol/L) und einem Gesamtvolumen von $150\text{ }\mu\text{L}$ präpariert (vgl. Tabelle 39). Die Proben wurden in Eppendorfgefäße überführt und mit $150\text{ }\mu\text{L}$ Ellmans-Reagenz (**147**) ($1\text{ mg DTNB-Dinatriumsalz/mL}$) versetzt. Die Proben wurden verschlossen und für 10 min bei $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert und geschüttelt.

Tabelle 39: Präparation der Referenzlösungen.

c(Ac-Cys-OH)	V(Stamm)	V(Stamm)	V(Photopuffer)
[mol/L]	V(Stamm) (c = 10 ⁻⁵ mol/L) [μL]	(c = 10 ⁻⁴ mol/L) [μL]	[μL]
1x10E-5	150		
2x10E-5		30	120
3x10E-5		45	105
4x10E-5		60	90
5x10E-5		75	75
6x10E-5		90	60
7x10E-5		105	45
8x10E-5		120	30
9x10E-5		135	15
1x10E-4		150	0

▪ Absorptionsmessungen

Die Reaktionslösungen wurden in eine 96-Well-Platte (*Falcon*, Flat transparent, PS) überführt und die Absorption bei 412 nm bestimmt. Als Referenz wurde eine Basislinie (412 nm) gegen die verwendeten Photolyse-Puffer **2** und **4** gemessen.

**Abbildung 631:** Absorptionsspektrum von 5-Thio-2-nitrobenzoesäure (148) (Ellman-Assay) (c = 8x10⁻⁵ mol/L) in Puffer 2.

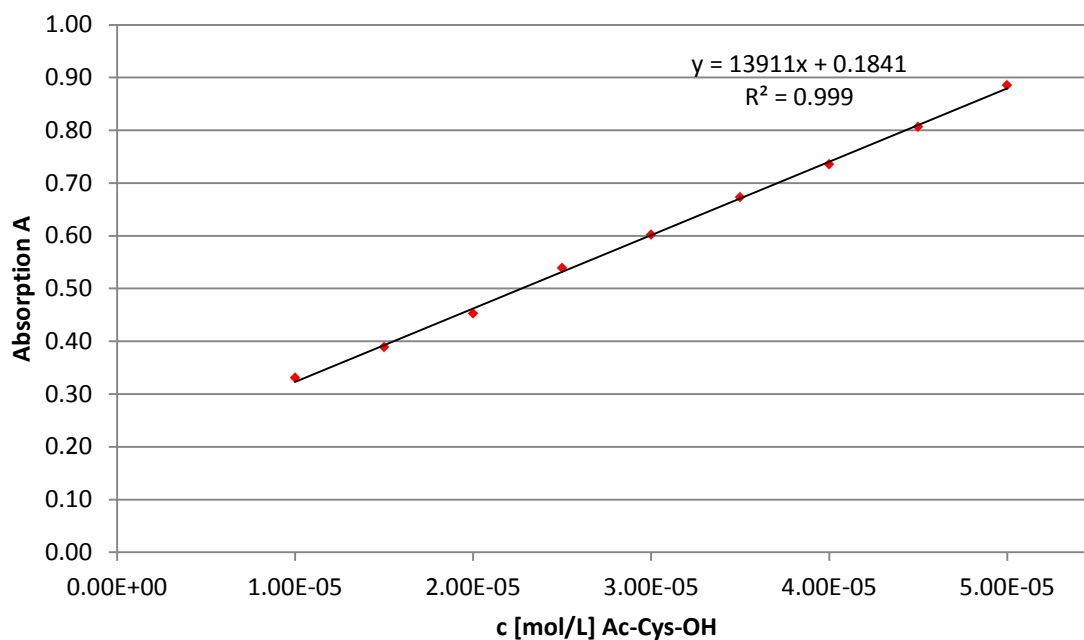


Abbildung 632: Konzentrationsabhängige Absorption A von 5-Thio-2-nitrobenzoesäure (148) (Ellman-Assay) in Puffer 2.

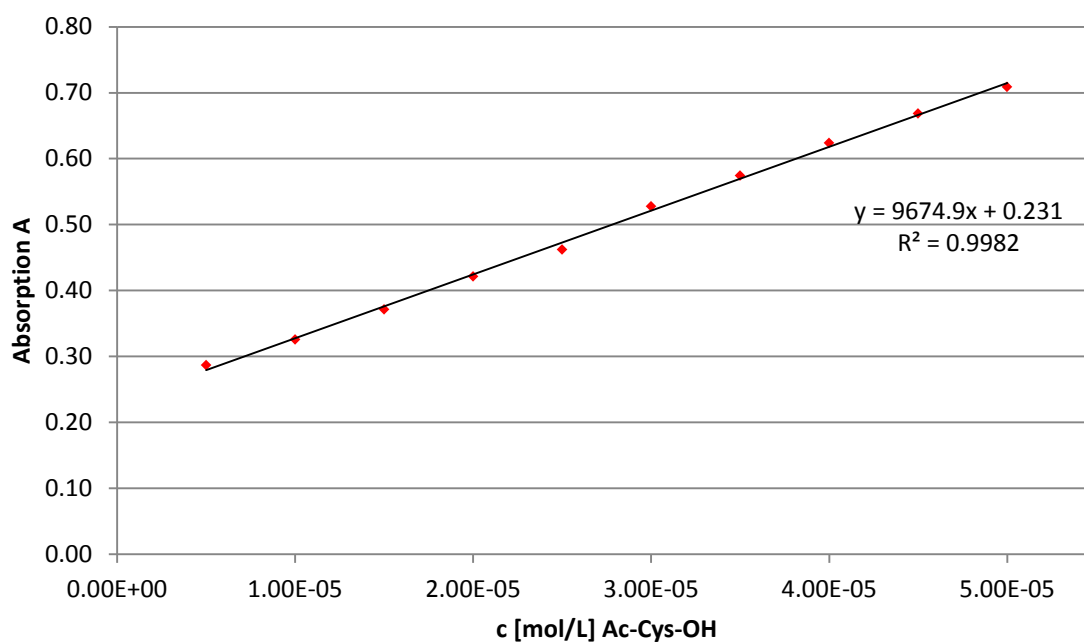


Abbildung 633: Konzentrationsabhängige Absorption A von 5-Thio-2-nitrobenzoesäure (148) (Ellman-Assay) in Puffer 4.

Tabelle 40: Konzentrationsabhängige Absorption A von 5-Thio-2-nitrobenzoesäure (148) (Ellman-Assay) in Puffer 2.

PBS-Puffer ($c = 10$ mM, $pH = 6.0$)									
c [mol/L]	1.00E-05	1.50E-05	2.00E-05	2.50E-05	3.00E-05	3.50E-05	4.00E-05	4.50E-05	5.00E-05
A	0.3304	0.3889	0.4528	0.5385	0.6021	0.6731	0.7353	0.8067	0.8855

Tabelle 41: Konzentrationsabhängige Absorption A von 5-Thio-2-nitrobenzoesäure (148) (Ellman-Assay) in Puffer 4.

MES-Puffer ($c = 375$ mM, $pH = 5.5$)										
c [mol/L]	0.500E-05	1.00E-05	1.50E-05	2.00E-05	2.50E-05	3.00E-05	3.50E-05	4.00E-05	4.50E-05	5.00E-05
A	0.2869	0.3258	0.3714	0.4212	0.4621	0.5277	0.5742	0.6236	0.6684	0.7089

5.8.2 Photolyseexperimente mit der Modellverbindung 172

▪ Photolyseprotokoll^[213]

Die Photolyseexperimente mit der Modellverbindung **172** wurden in zwei unterschiedlichen Photopuffern durchgeführt, um die spätere Tauglichkeit für die Liposomenexperimente zu überprüfen. Photosubstrat *N*-Ac-cystein-(*S*-*o*-NO₂-benzyl)-gly-OMe **172** (4.45 mg, 0.012 mmol) wurde mit einer Konzentration von je 0.1 mmol/L in Photolysepuffer **2** (50 mM Semicarbazid hydrochlorid, 20 mM L-(-)-Ascorbinsäure in MeCN : PBS (0.01 M) = 1:1, pH = 6.0) und Photolysepuffer **4** (50 mM Semicarbazid hydrochlorid, 20 mM L-(-)-Ascorbinsäure in MeCN : MES (375 mM) = 1:1, pH = 5.5) gelöst. Jeweils 15 Proben (V = 150 µL) wurden in eine 96-Well Platte (*Falcon*, Flat transparent, PS) überführt. Über den Lösungen wurde eine 500 W/cm² UV-Lampe (*Benda* NU-8 KL) im Abstand von 0.5 cm platziert. Die Lösungen wurden mit einer Wellenlänge von 366 nm bestrahlt. Die Proben wurden nach unterschiedlichen Zeiträumen (1 – 75 min) mit 150 µL DTNB-Natriumsalz (**147**) (1 mg/mL) versetzt, für 10 min bei RT inkubiert und geschüttelt. Anschließend wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 412 nm bestimmt. Aus den Extinktionswerten kann im Folgenden mit Hilfe der Kalibrierfunktion der zeitliche Umsatz der Photolyse bestimmt werden.

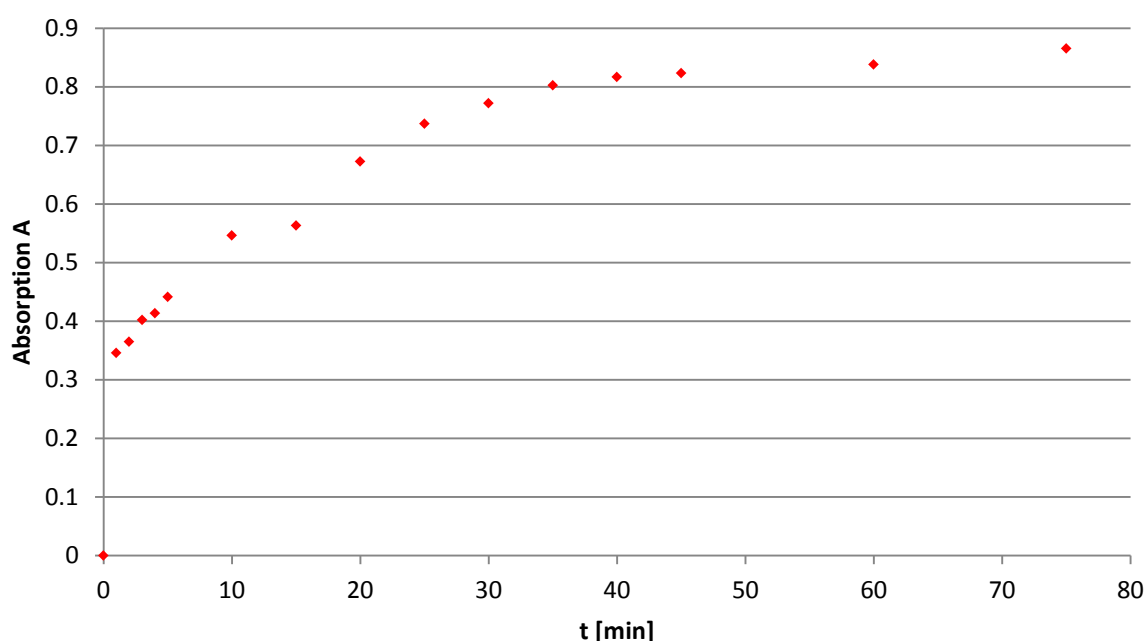


Abbildung 634: Fortschritt der Photolyse von 172 in Photopuffer 2 (spektroskopisch gemessen via Ellman's Assay).

Tabelle 42: Photolyse in Photopuffer 2 (spektroskopische Bestimmung via Ellman's Assay)

Photolyse von XX in Photopuffer 2															
t [min]	1	2	3	4	5	10	15	20	25	30	35	40	45	60	75
A	0.3456	0.3648	0.402	0.4134	0.441	0.5462	0.5632	0.6724	0.7366	0.7718	0.8022	0.8166	0.823	0.8376	0.8648

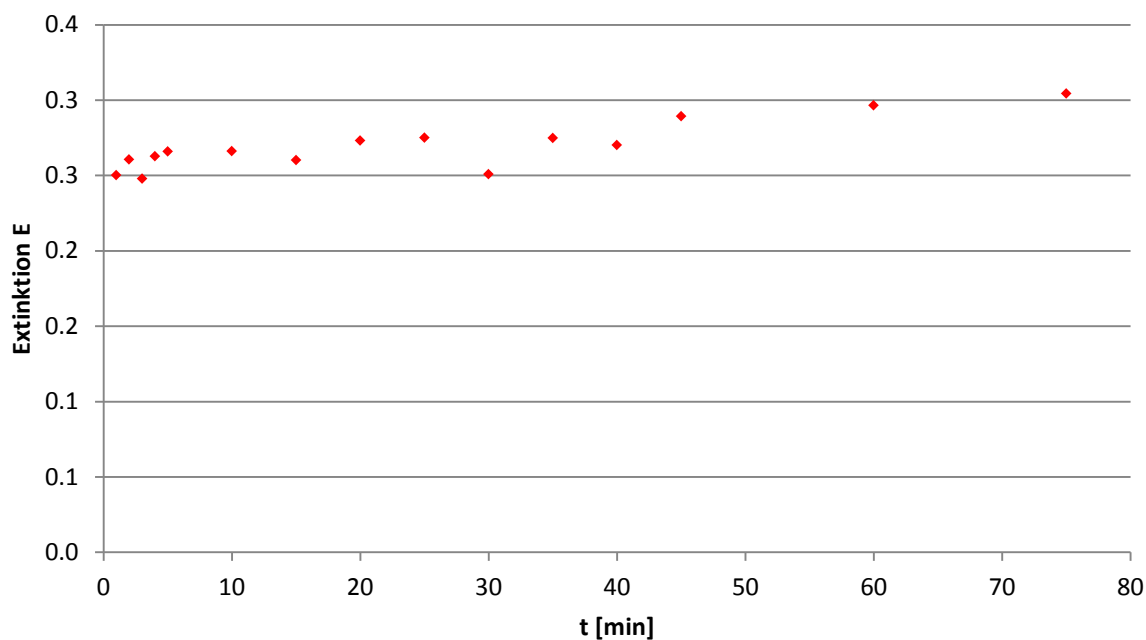


Abbildung 635: Fortschritt der Photolyse von 172 in Photopuffer 4 (spektroskopisch gemessen via Ellman's Assay).

Tabelle 43: Photolyse in Photopuffer 4 (spektroskopisch Bestimmung via Ellman's Assay).

Photolyse von XX in Photopuffer 4															
t [min]	1	2	3	4	5	10	15	20	25	30	35	40	45	60	75
A	0.2502	0.2606	0.2478	0.2627	0.2658	0.2662	0.2602	0.2731	0.275	0.2509	0.2748	0.2702	0.2893	0.2964	0.3044

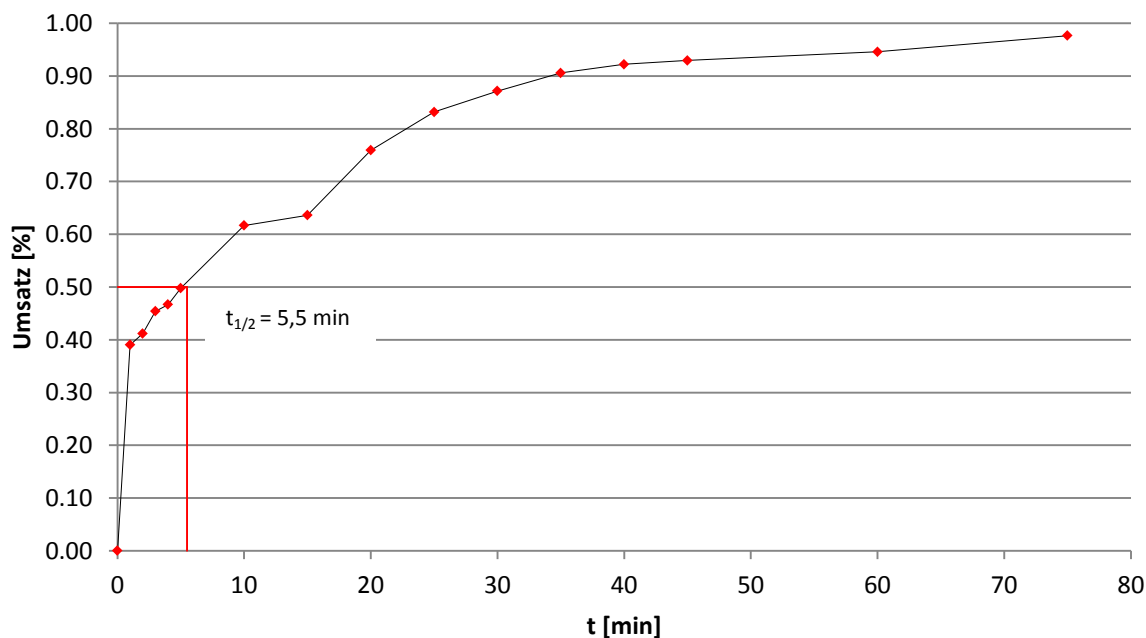


Abbildung 636: Umsatz [%] der Photolyse von 172 in Photopuffer 2 (spektroskopisch gemessen via Ellman's Assay).

Tabelle 44: Umsatz [%] der Photolyse von 172 in Photopuffer 2 (spektroskopisch gemessen via Ellman's Assay).

Umsatz [%] der Photolyse von XX in Photopuffer 2															
t [min]	1	2	3	4	5	10	15	20	25	30	35	40	45	60	75
A	0.3456	0.3648	0.4020	0.4134	0.4410	0.5462	0.5632	0.6724	0.7366	0.7718	0.8022	0.8166	0.823	0.8376	0.8648
A/A ₀ [%]	0.39	0.41	0.45	0.47	0.50	0.62	0.62	0.76	0.83	0.87	0.91	0.92	0.93	0.95	0.98

Für die Photolyse in Puffer **2** lässt sich eine Halbwertszeit von 5.5 min ermitteln. Nach ca. 30 min sind ca. 90 % der Photoschutzgruppe abgespalten. Für die Photolyse in Puffer **4** lassen sich keine reproduzierbaren Ergebnisse ermitteln.

5.8.3 Photolyseexperimente mit dem halben Baustein **173** in DMPC/DPPC-Liposomen

▪ Liposomenpräparation und Photolyseprotokoll^[213]

Zur Präparation einer 10^{-4} molaren Stammlösung des *o*-nitrobenzylgeschützten Bausteins **173** wurden 66.0 mg (9.323×10^{-5} mol) in 9.323 mL Chloroform gelöst. Aus dieser 10^{-2} molaren Lösung wurde über eine Verdünnungsreihe eine 10^{-4} molare Stammlösung hergestellt. Die Stammlösung wurde bei -18°C gelagert. Die Präparationen einer unilamellaren Liposomenlösung (DMPC/DPPC = 75 % - 25 % , $c = 2$ mmol/L, 10 % Dotierung mit **173**) erfolgte entsprechend der Vorschrift 5.4. Als Pufferlösung wurde Photopuffer **3** verwendet (PBS-Puffer, 0.01 M, pH = 6.0, 0.5 mM Semicarbazid, 0.2 mM L-(-)-Ascorbinsäure). Jeweils 15 Proben ($V = 150\ \mu\text{L}$) wurden in eine 96-Well Platte (*Falcon*, Flat transparent, PS) überführt. Über den Lösungen wurde eine $500\ \text{W}/\text{cm}^2$ UV-Lampe (*Benda* NU-8 KL) im Abstand von 0.5 cm platziert. Die Lösungen wurden mit einer Wellenlänge von 366 nm bestrahlt. Die Proben wurden nach unterschiedlichen Zeiträumen (1 – 75 min) mit $150\ \mu\text{L}$ DTNB-Natriumsalz (**147**) (1 mg/mL) versetzt, für 10 min bei RT inkubiert und geschüttelt. Anschließend wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 412 nm bestimmt. Als Referenz wurde eine Basislinie bei 412 nm gegen ein undotiertes Liposom (DMPC/DPPC = 75 % - 25 % , $c = 2$ mmol/L) gemessen. Aus den Extinktionswerten kann im Folgenden mit Hilfe der Kalibrierfunktion der zeitliche Umsatz der Photolyse bestimmt werden.

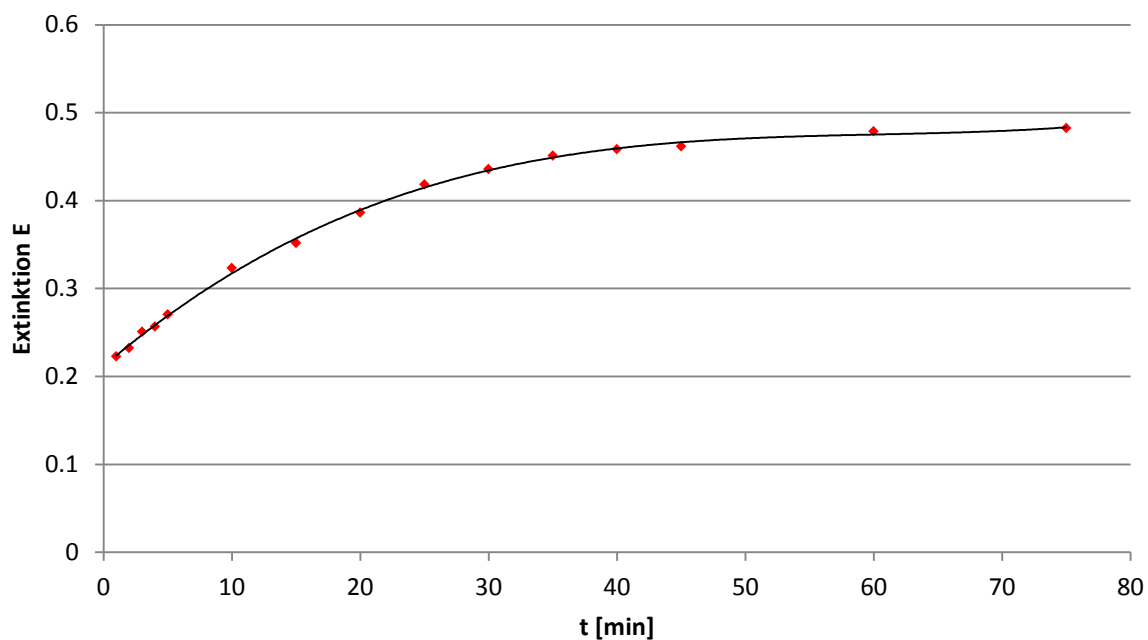


Abbildung 637: Fortschritt der Photolyse von 173 in Photopuffer 3 (spektroskopisch gemessen via Ellman's Assay).

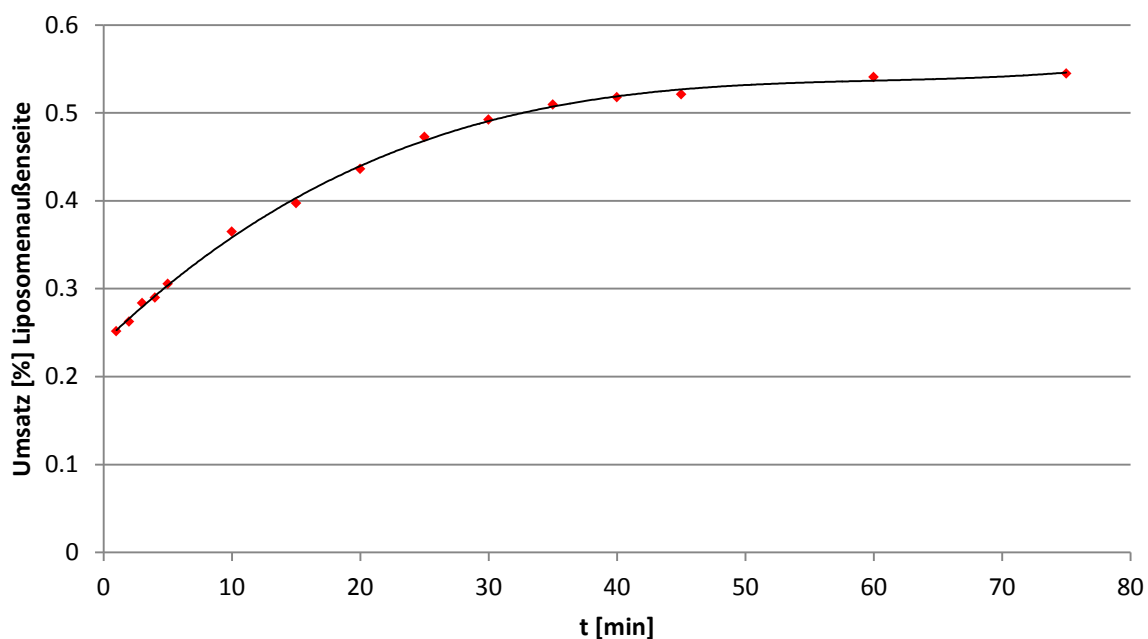


Abbildung 638: Umsatz der Photolyse [%] von 173 in Photopuffer 3 (spektroskopisch gemessen via Ellman's Assay).

Tabelle 45: Umsatz [%] der Photolyse von 173 in Photopuffer 3 (spektroskopisch gemessen via Ellman's Assay).

Umsatz [%] der Photolyse von XX in Photopuffer 2															
t [min]	1	2	3	4	5	10	15	20	25	30	35	40	45	60	75
A	0.2228	0.2324	0.2510	0.2567	0.2705	0.3231	0.3516	0.3862	0.4183	0.4359	0.4511	0.4583	0.4615	0.4788	0.4824
A/A0	0.25	0.26	0.28	0.29	0.31	0.36	0.40	0.44	0.47	0.49	0.51	0.52	0.52	0.54	0.55

5.9 Experimente mit dem BIPM-Fluorophor 171

5.9.1 Vorbereitende Experimente mit der Modellverbindung 171

▪ Fluoreszenzspektren von BIPM-COOMe 171

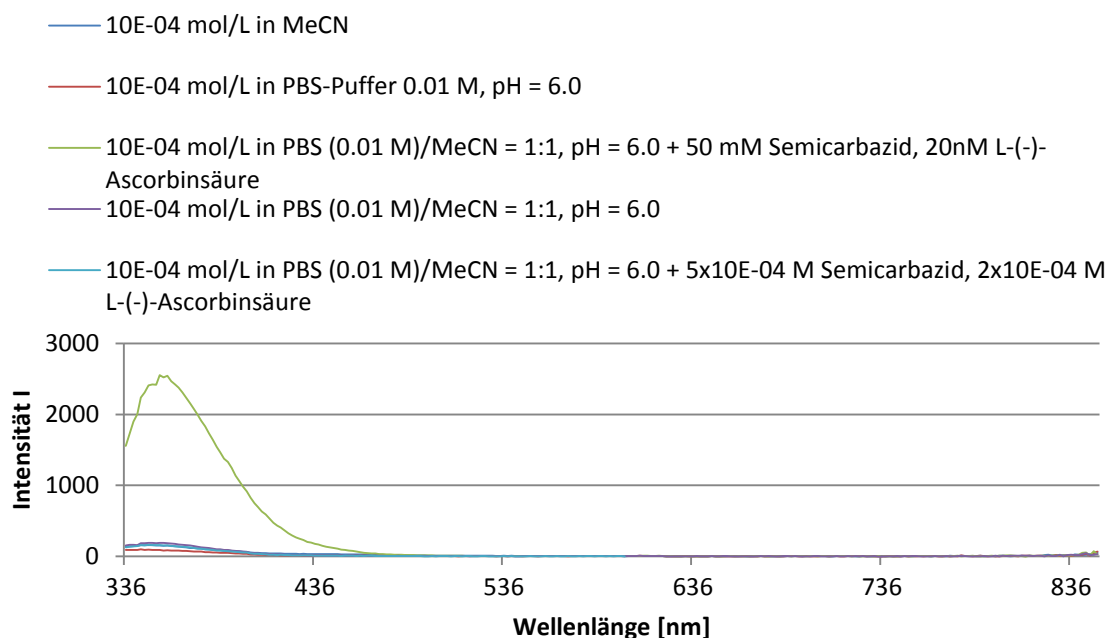


Abbildung 639: Fluoreszenzspektren von 171 in unterschiedlichen Photopuffern.

Den Fluoreszenzspektren von BIPM-COOMe **171** ist zu entnehmen, dass außer in Photopuffer **2** keine Fluoreszenzemission bei der charakteristischen Wellenlänge von 354 nm vorliegt. Die signifikante Emission bei 354 nm in Photopuffer **2** könnte durch eine ungewollte Reaktion des Michael-Systems von **171** mit dem in hoher Konzentration vorliegendem Carbonyl-Scavenger Semicarbazid zu erklären sein.

5.9.2 Fluoreszenzaktivierung von BIPM-COOMe 171 mit N-Ac-cystein-OH

▪ Präparation der Stammlösungen von BIPM-COOMe 171

Zur Präparation einer 10^{-4} molaren Stammlösungen der Modellverbindung **171** wurden 3.091 mg (8.899×10^{-6} mol) BIPM-COOMe **171** in 100 μL Aceton gelöst und mit 790 μL Photolysepuffer **5** (MeCN/PBS = 1:1, 0.5 mM Semicarbazid, 0.2 mM L-(-)-Ascorbinsäure, pH = 6.0) versetzt. Aus dieser 10^{-2} molaren Lösung wurde über eine Verdünnungsreihe eine 10^{-4} molare Stammlösung erhalten. Die Stammlösung wurde bei -18°C gelagert.

▪ Fluoreszenzmessungen

Für die Fluoreszenzmessungen wurden Proben von N-Ac-cystein-OH **XX** unterschiedlicher Konzentration (10^{-5} - 10^{-4} mol/L) und einem Gesamtvolumen von 150 μL präpariert (vgl. Tabelle 39). Die Proben wurden in Eppendorfgefäße überführt und mit 150 μL BIPM-COOMe **171** ($c = 10^{-4}$ mol/L) versetzt. Die Proben wurden verschlossen und für 10 min bei 25°C inkubiert und geschüttelt. Die Reaktionslösungen wurden in eine 96-Well-Platte (Falcon, Flat black, PS) überführt und die Emission bei 354 nm bestimmt. Als Referenz wurde eine Basislinie ($\lambda = 354$ nm) gegen den verwendeten Photolyse-Puffer **5** gemessen.

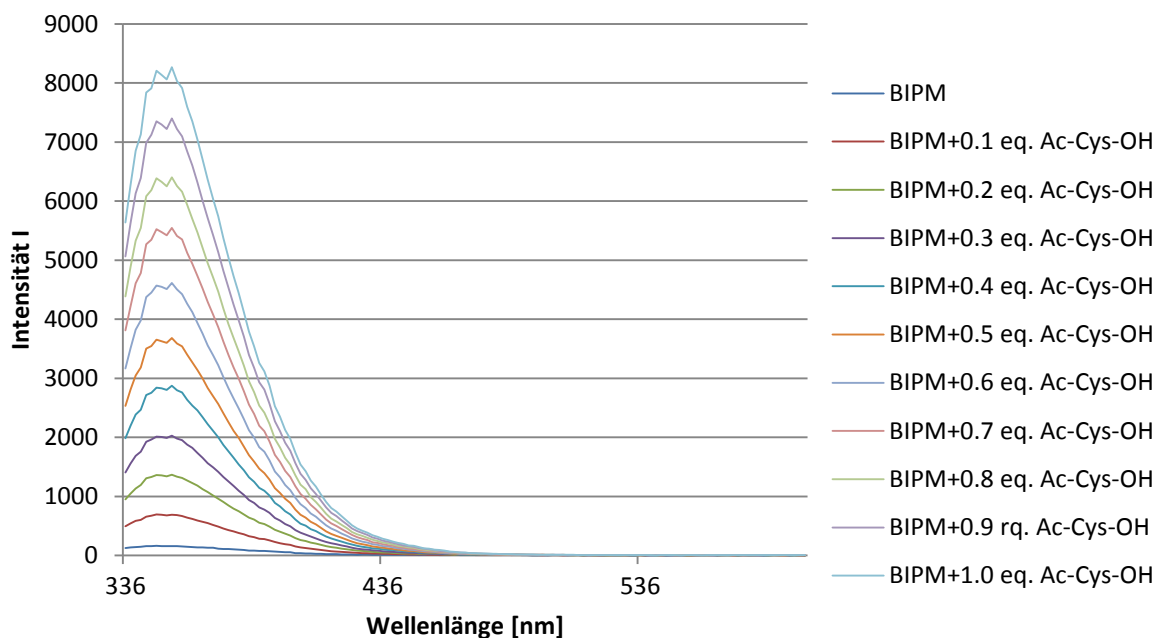


Abbildung 640: Emissionsspektren von **171** ($c = 10^{-4}$ mol/L) in Gegenwart von N-Ac-cystein-OH (0.1-1.0 eq.).

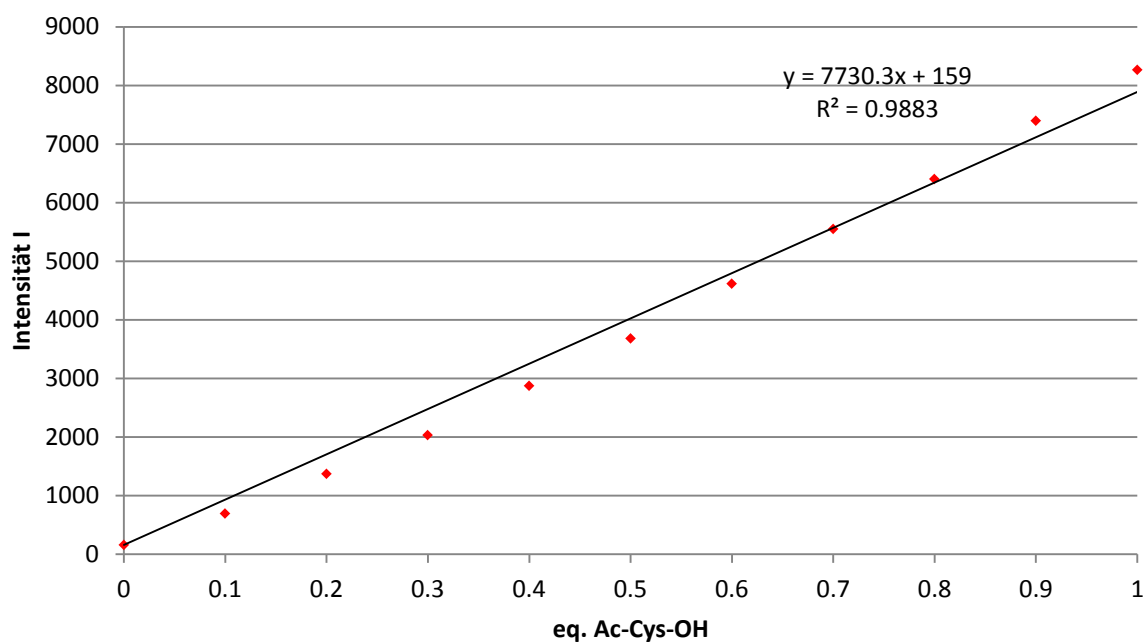


Abbildung 641: Fluoreszenzintensitäten I am Emissionsmaximum ($\lambda = 354$ nm) von 171 in Gegenwart von 0.1-1.0 eq. N-Ac-cystein-OH.

5.10 Bestimmung der Phasenübergangstemperaturen

Der Umgebungssensitive Fluorophor Laurdan (**24**) (6-Dodecanoyl-2-*N,N'*-dimethylaminonaphthalin) kann als hochempfindliche Fluoreszenzsonde für die Detektion von Phasenübergängen in Modellmembranen verwendet werden, da das Emissionsmaximum stark vom Zustand der Membran abhängt. In unpolaren Medien liegt das Emissionsmaximum bei niedrigen Wellenlängen (350 – 440 nm) in polaren Medien bei höheren Wellenlängen (460 – 490 nm).

■ UV-Vis- und Fluoreszenzspektren der Fluoreszenzsonde Laurdan (**24**) in Lösung

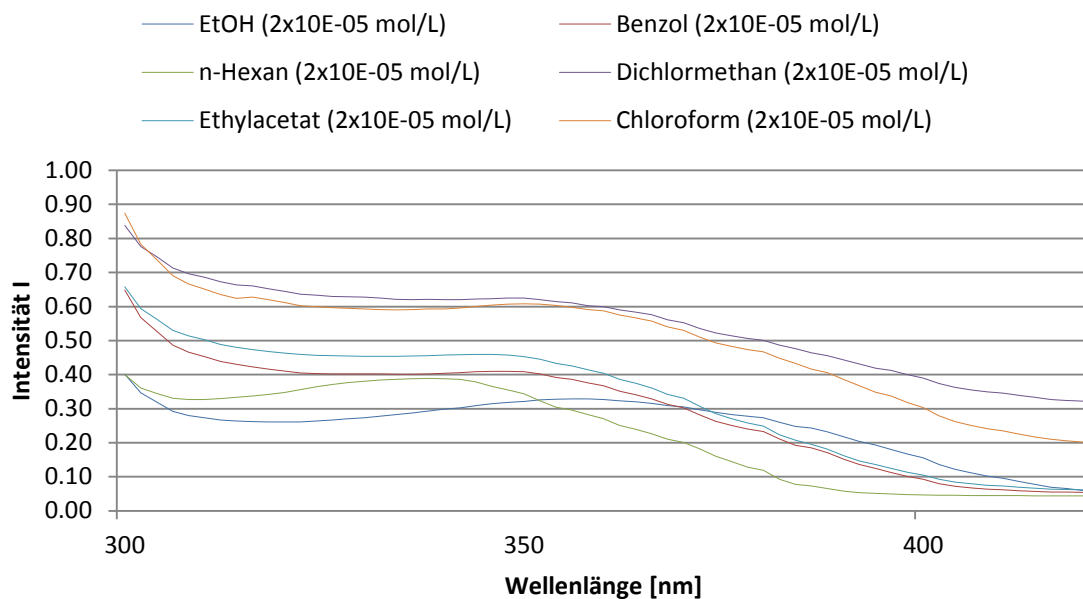


Abbildung 642: Absorptionsspektren von Laurdan (**24**) ($c = 2 \times 10^{-5}$ mol/L) in verschiedenen Lösungsmitteln.

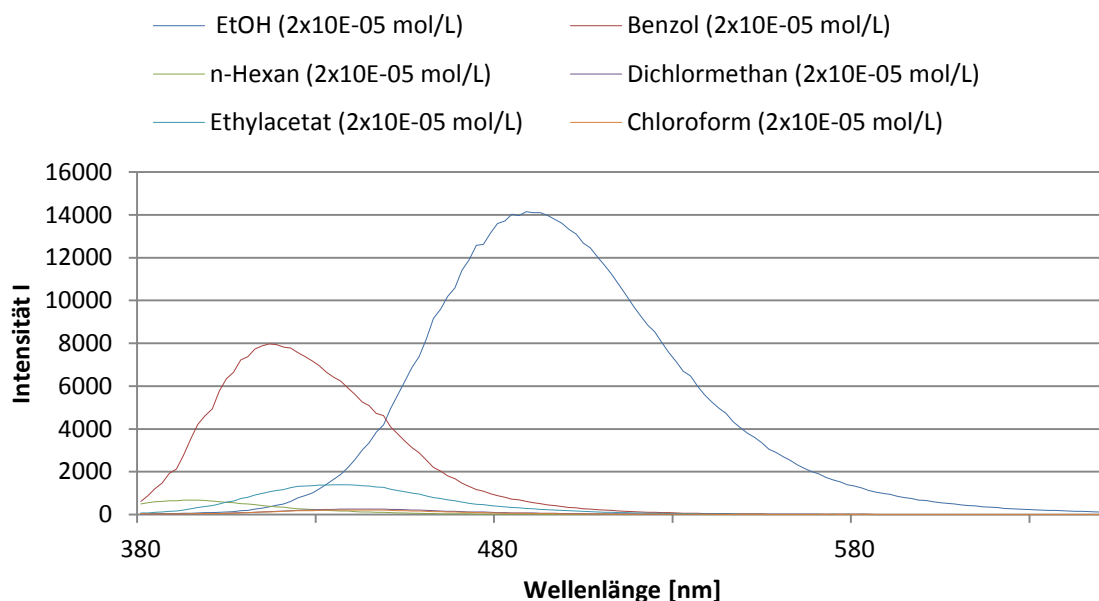


Abbildung 643: Emissionsspektren von Laurdan (**24**) ($c = 2 \times 10^{-5}$ mol/L) in verschiedenen Lösungsmitteln.

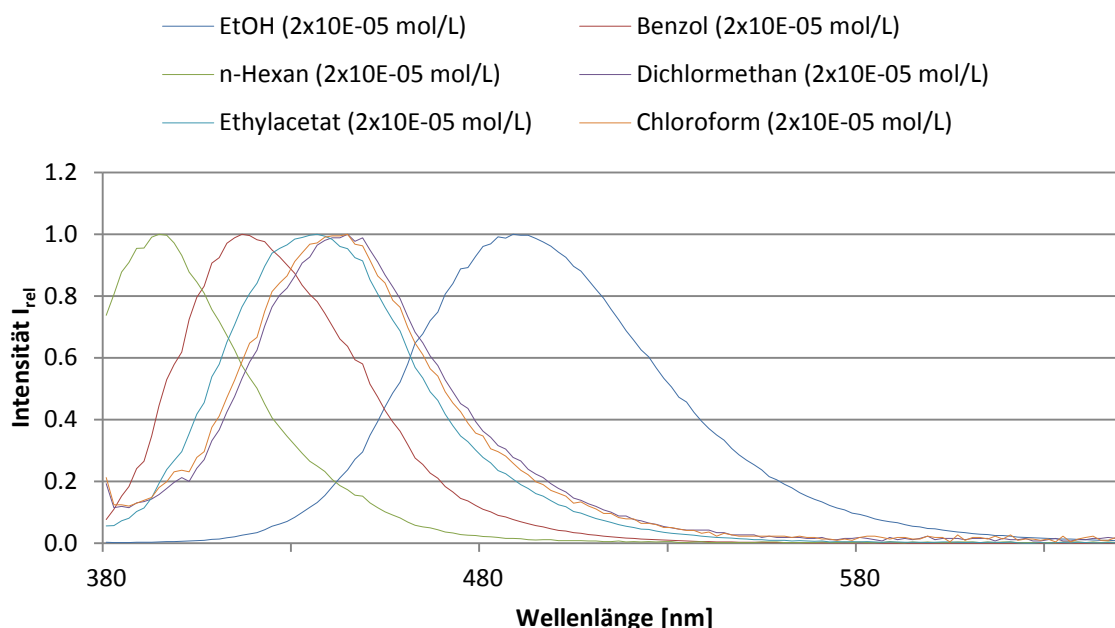


Abbildung 644: Emissionsspektren von Laurdan (24) ($c = 2 \times 10^{-5}$ mol/L) in verschiedenen Lösungsmitteln (bereinigte Intensitäten).

▪ Präparation der Liposomenlösungen

Zur Präparation der Liposomen wurden als Liposomenmatrixmaterial 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (16:0) (**DDPC**, MW = 734.04 g/mol, $T_C = 41$ °C) und 1,2-Dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (14:0) (**DMPC**, MW = 677.90 g/mol, $T_C = 23$ °C) verwendet. Je 250 mg DPPC bzw. DMPC wurden zur Herstellung von Stammlösungen in je 25 mL Chloroform gelöst und bei -18 °C gelagert ($c(\text{DPPC}) = 13.62$ mmol/L, $c(\text{DMPC}) = 14.76$ mmol/L). Für die Präparation unilamellarer Liposomen wurden Lipidlösungen geringerer Konzentration ($c = 2$ mmol/L) verwendet und bei Bedarf aus den Stammlösungen hergestellt.

▪ Präparation der Laurdan-Stammlösung

Zur Präparation einer 10^{-4} molarer Stammlösung der Fluoreszenzsonde Laurdan (**24**) wurden 3.535 mg (10^{-2} mol) in 1 mL CH_2Cl_2 gelöst. Aus dieser 10^{-2} molaren Lösung wurden über eine Verdünnungsreihe eine 10^{-4} molare Stammlösung erhalten. Die Stammlösung wurde bei -18 °C gelagert.

▪ Liposomenpräparation

Die Herstellung der mit (**24**) dotierten unilamellaren Liposomen (LUV's) erfolgte nach folgender Vorschrift:

Die Liposomenlösung der unterschiedlichen Phosphatidylcholin-Mischungen wurde entsprechend Tabelle 46 hergestellt, so dass sich eine resultierende Gesamtkonzentration $c(\text{DMPC/DDPC}) = 2 \text{ mmol/L}$ und ein Gesamtvolumen von $1000 \mu\text{L}$ ergibt.

Tabelle 46: Präparation der Liposomenmischungen.

Verhältnis DMPC:DPPC	V(DMPC)/[μL]	Konz.(DMPC)/[mol/L]	V(DPPC)/[μL]	Konz.(DPPC)/[mol/L]
0:100	0	0	1000	2×10^{-3}
25:75	250	0.5×10^{-3}	750	1.5×10^{-3}
50:50	500	1.0×10^{-3}	500	1.0×10^{-3}
75:25	750	1.5×10^{-3}	250	0.5×10^{-3}
90:10	900	1.8×10^{-3}	100	0.2×10^{-3}
100:0	1000	2×10^{-3}	0	0

Zur Herstellung unilamellarer Liposomen, bestehend aus einer Liposomenmatrix und einer Dotierung mit 1.0 % Laurdan (**24**) wurden die entsprechenden Volumina an DMPC-Stammlösung, DPPC-Stammlösung (Tabelle 46) und $200 \mu\text{L}$ der 10^{-4} molaren Stammlösung von Laurdan (**24**) in CH_2Cl_2 in einen 10 mL Rundkolben gegeben. Das Lösungsmittelgemisch wurde am Rotationsverdampfer bis zu Trockne eingengt und anschließend gefriergetrocknet. Hierzu wurde der Kolben 10 min in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend min. 4 h lyophilisiert. Die resultierenden Filme, bestehend aus den Phosphatidylcholinen und der Fluoreszenzsonde Laurdan (**24**) wurden anschließend in 1 mL MES-Puffer (375 mmol, pH = 5.5) aufgenommen und für min. 1 min gevortext. Die Liposomenlösung wurde mit Hilfe des LiposoFast Basic/Stabilisator®-Systems zur Herstellung unilamellarer Liposomen min. 19 mal (ungerade Extrusionzyklen) durch eine 200 nm Polycarbonatmembran extrudiert. Die so erhaltene wässrige unilamellare Liposomenlösung ($c = 2 \text{ mmol/L}$, Dotierung 1 %) wurde zur Vermessung am Fluoreszenzspektrometer bereitgehalten. Die Präparation der Liposomen mit anderen Lipidmischungsverhältnissen und unterschiedlichen Dotierungen erfolgte in analoger Weise.

▪ Fluoreszenzmessungen

1 mL der wässrigen Liposomenlösung wurden in eine Quarzglas-Rundküvette (Durchmesser = 1 cm) überführt und mittels eines Peltier-Elements auf 5°C temperiert und 15 min inkubiert. Nachfolgend wurde ein Übersichtsspektrum gemessen (380 nm – 700 nm, $\lambda_{\text{Ex}} = 350 \text{ nm}$) und die Intensitätswerte der Emissionsmaxima bei 435 nm und 476 nm bestimmt. Die Emissionsspektren wurden über einen Temperaturbereich von 5°C – 50°C in Schritten von 2°C gemessen. Nach dem Erwärmen um 2°C – 5°C wurde die Probe jeweils 15 min inkubiert. Als Referenz wurde jeweils eine Basislinie (380 – 700 nm) gegen den verwendeten MES-Puffer **1** gemessen.

5.10.1 Bestimmung der Phasenübergangstemperatur von DMPC/DPPC-Liposomen

Durch den Einbau der Fluoreszenzsonde Laurdan (**24**) können die Phasenübergänge der Phospholipidgemische detektiert werden, da sich die Emissionsspektren von Laurdan in der Gelphase (Emissionsmaximum 441 nm) und der flüssig-kristallinen Phase (Emissionsmaximum 477 nm) deutlich unterscheiden. Zur quantitativen Beschreibung der Phasenkoexistenz und der Phasenübergänge kann auf das Konzept der „verallgemeinerten Polarisation“ (*Generalized Polarisation, GP*) zurückgegriffen werden:^[26-28,236]

$$GP = \frac{I_B - I_R}{I_B + I_R} \quad (10)$$

I_B und I_R sind die Intensitäten der Fluoreszenzemission im blauen und im roten Bereich des Spektrums. Somit entspricht I_B der Wellenlänge 441 nm und I_R der Wellenlänge 477 nm. Durch Auftragung des GP-Wertes gegen die Temperatur T [° C] kann die Phasenübergangstemperatur T_C durch einen sigmoidalen Fit als Wendepunkt der Funktion ermittelt werden. Der dimensionslose GP-Wert erlaubt eine Beurteilung des Membranzustandes bezüglich der Polarität. Somit können die Zustände unterschiedlicher Membranen im Hinblick auf Polarität und Fluidität verglichen werden.

Im Folgenden sind zu jeder Messreihe der verschiedenen Phospholipidmischungen folgende Spektren und Tabellen angegeben:

- Die temperaturabhängigen Fluoreszenzemissionsspektren (380 nm – 700 nm, $\lambda_{\text{Ex}} = 350$ nm) in Schritten von 2-5 °C.
 - Die Funktion der GP-Werte in Abhängigkeit der Temperatur T [° C].
 - Eine Zusammenfassung der Fluoreszenzintensitäten I_B und I_R und der GP-Werte als Funktion der Temperatur T [° C].
 - Eine Zusammenfassung der charakteristischen Werte für das jeweils betrachtete System.
-

▪ **Liposomen mit 100 % DMPC-Anteil**

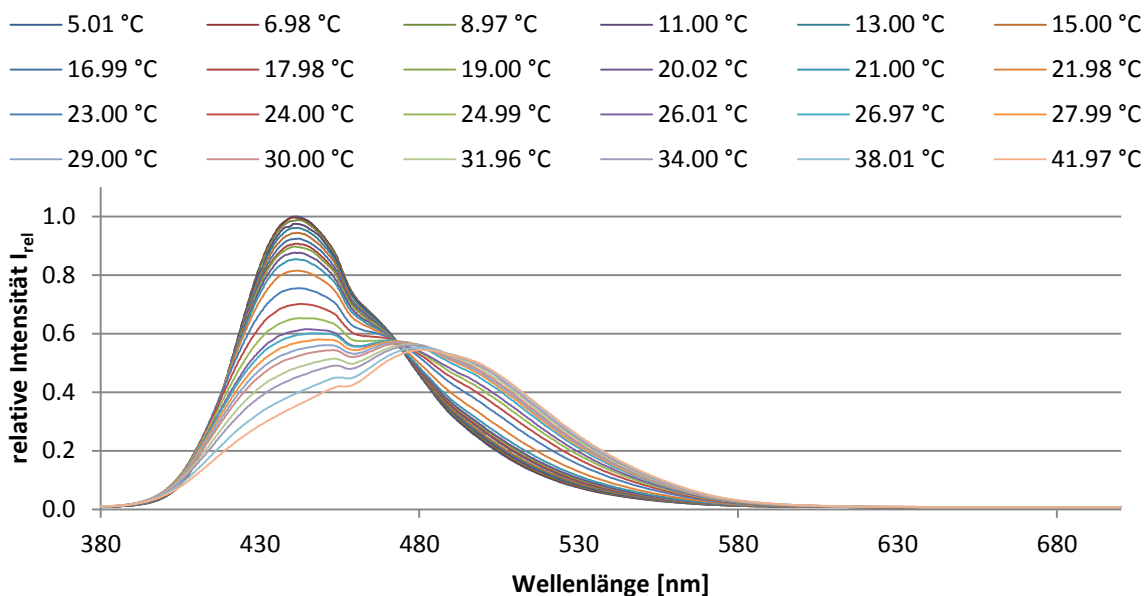


Abbildung 645: Temperaturabhängige Emissionsspektren von 1 % Laurdan (24) in 100 % DMPC.

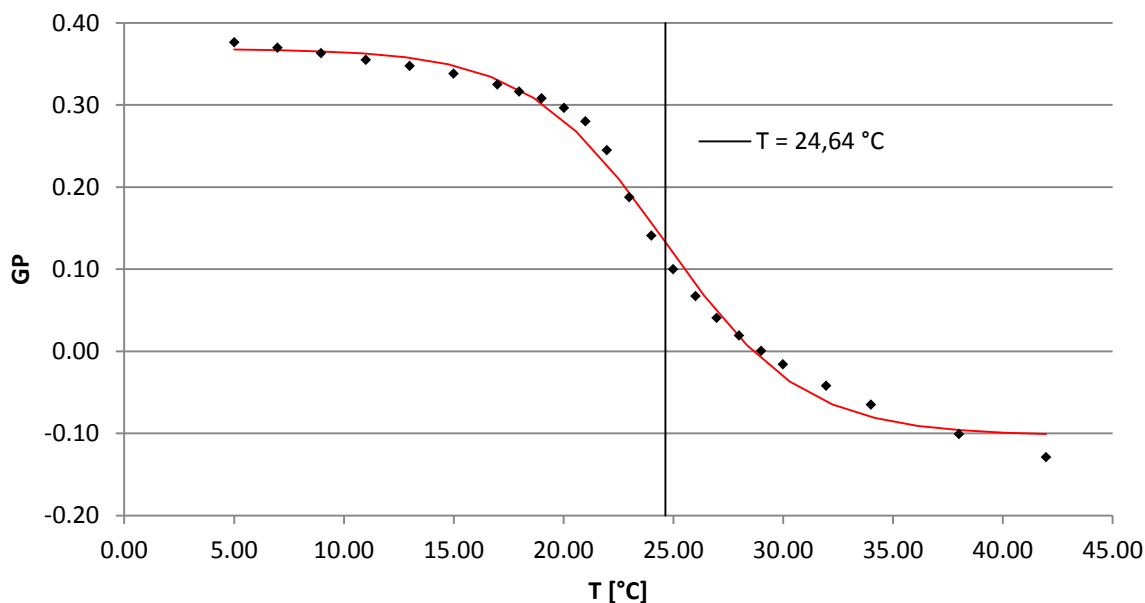
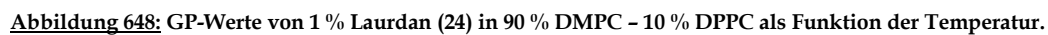


Abbildung 646: GP-Werte von 1 % Laurdan (24) in 100 % DMPC als Funktion der Temperatur.

Tabelle 47: Charakteristische Werte für das System 100 % DMPC.

100 % DMPC [$T_c = 24,64 \text{ °C}$]																								
$T \text{ [°C]}$	5,01	6,98	8,97	11,00	13,00	15,00	16,99	17,98	19,00	20,02	21,00	21,98	23,00	24,00	24,99	26,01	26,97	27,99	29,00	30,00	31,96	34,00	38,01	41,97
$I(441 \text{ nm})$	1,00	1,00	0,99	0,98	0,96	0,94	0,92	0,91	0,90	0,88	0,85	0,82	0,75	0,70	0,65	0,61	0,59	0,57	0,54	0,52	0,48	0,45	0,40	0,35
$I(477 \text{ nm})$	0,45	0,46	0,46	0,46	0,47	0,47	0,47	0,47	0,47	0,48	0,48	0,49	0,52	0,53	0,53	0,54	0,55	0,56	0,56	0,56	0,56	0,56	0,55	0,54
GP-Wert	0,38	0,37	0,36	0,35	0,35	0,34	0,32	0,32	0,31	0,30	0,28	0,24	0,19	0,14	0,10	0,06	0,03	0,01	-0,01	-0,04	-0,07	-0,11	-0,16	-0,21
GP-Wert (Gelphase)	0,38			GP-Wert (fluide Phase)							Phasenkoexistenzgebiet						13-34 °C							

4.99 °C 6.99 °C 9.01 °C 11.01 °C 13.00 °C 15.00 °C 17.00 °C
18.00 °C 19.00 °C 20.00 °C 21.00 °C 22.00 °C 23.00 °C 24.00 °C
25.00 °C 26.00 °C 29.00 °C 35.00 °C 50.00 °C



90 % DMPC/10 % DPPC [$T_c = 26.06\text{ }^\circ\text{C}$]																			
$T\text{ [}^\circ\text{C]}$	4,99	6,99	9,01	11,01	13,00	15,00	17,00	18,00	19,00	20,00	21,00	22,00	23,00	24,00	25,00	26,00	29,00	35,00	50,00
I (437 nm)	1,00	0,99	0,98	0,96	0,95	0,93	0,90	0,89	0,86	0,84	0,81	0,77	0,74	0,72	0,70	0,67	0,62	0,50	0,36
I (477 nm)	0,47	0,47	0,48	0,49	0,50	0,50	0,51	0,52	0,53	0,54	0,55	0,56	0,57	0,59	0,61	0,61	0,62	0,63	0,60
GP	0,36	0,35	0,34	0,33	0,32	0,30	0,28	0,26	0,24	0,22	0,19	0,16	0,13	0,10	0,07	0,04	0,00	-0,11	-0,26
GP-Wert (Gelpase)	0,36		GP-Wert (fluide Phase)				-0,26	Phasenkoexistenzgebiet								10-45 $^\circ\text{C}$			

▪ Liposomen mit 75 % DMPC- und 25 % DPPC-Anteil

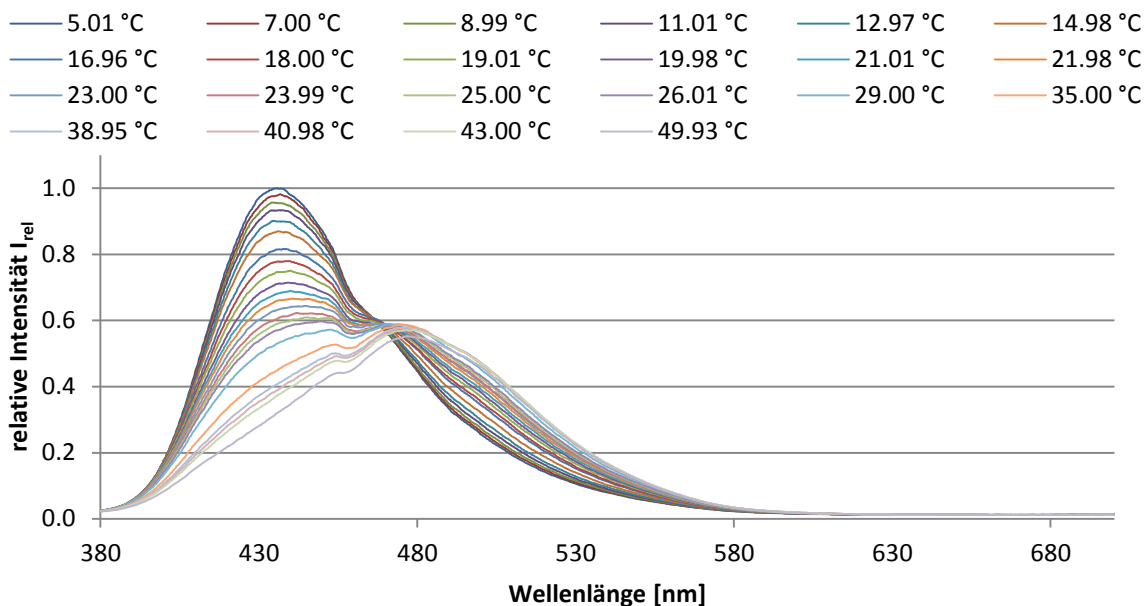


Abbildung 649: Temperaturabhängige Emissionsspektren von 1 % Laurdan (24) in 75 % DMPC - 25 % DPPC.

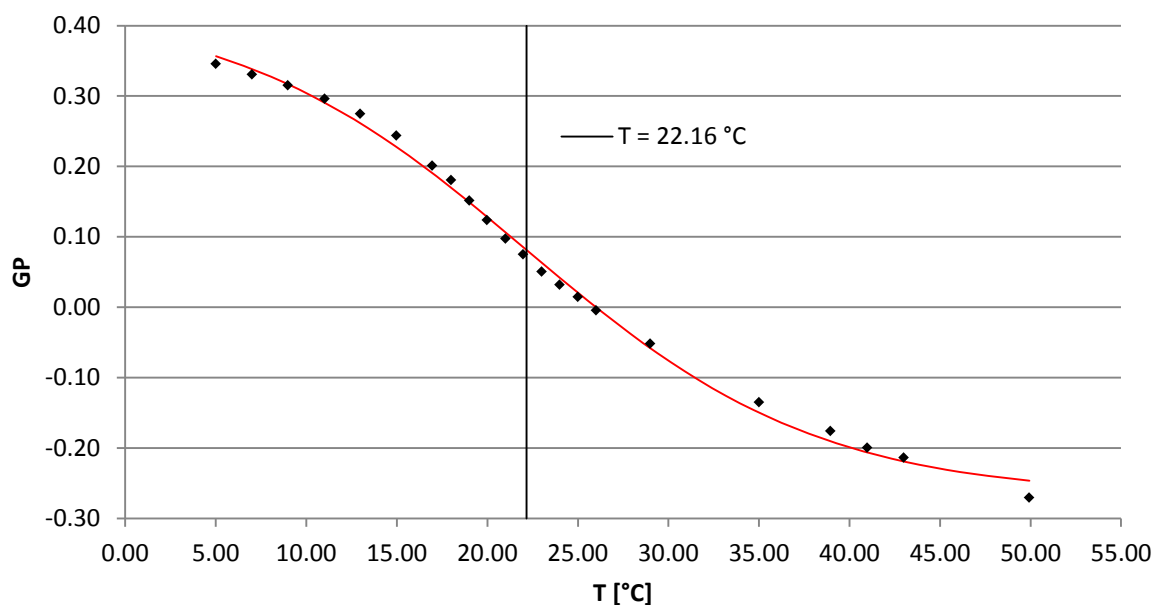


Abbildung 650: GP-Werte von 1 % Laurdan (24) in 75 % DMPC - 25 % DPPC als Funktion der Temperatur.

Tabelle 49: Charakteristische Werte für das System 75 % DMPC - 25 % DPPC.

75% DMPC/25% DPPC [T _c = 22.16 °C]																									
T[°C]	5,01	7,00	8,99	11,01	12,97	14,98	16,96	18,00	19,01	19,98	21,01	21,98	23,00	23,99	25,00	26,01	29,00	35,00	38,95	40,98	43,00	49,93			
I[435 nm]	1,00	0,98	0,96	0,93	0,90	0,87	0,81	0,78	0,75	0,71	0,68	0,66	0,63	0,61	0,59	0,57	0,53	0,45	0,41	0,39	0,37	0,32			
I[476 nm]	0,49	0,49	0,50	0,51	0,51	0,53	0,54	0,54	0,55	0,55	0,56	0,57	0,57	0,57	0,57	0,57	0,59	0,59	0,58	0,58	0,57	0,55			
GP	0,35	0,33	0,32	0,30	0,27	0,24	0,20	0,18	0,15	0,12	0,10	0,07	0,05	0,03	0,01	0,00	-0,05	-0,14	-0,18	-0,20	-0,21	-0,27			
GP-Wert (Gelphase)	0,35		GP-Wert (fluide Phase)					-0,27							Phasenkoexistenzgebiet					10-47 °C					

▪ Liposomen mit 50 % DMPC- und 50 % DPPC-Anteil

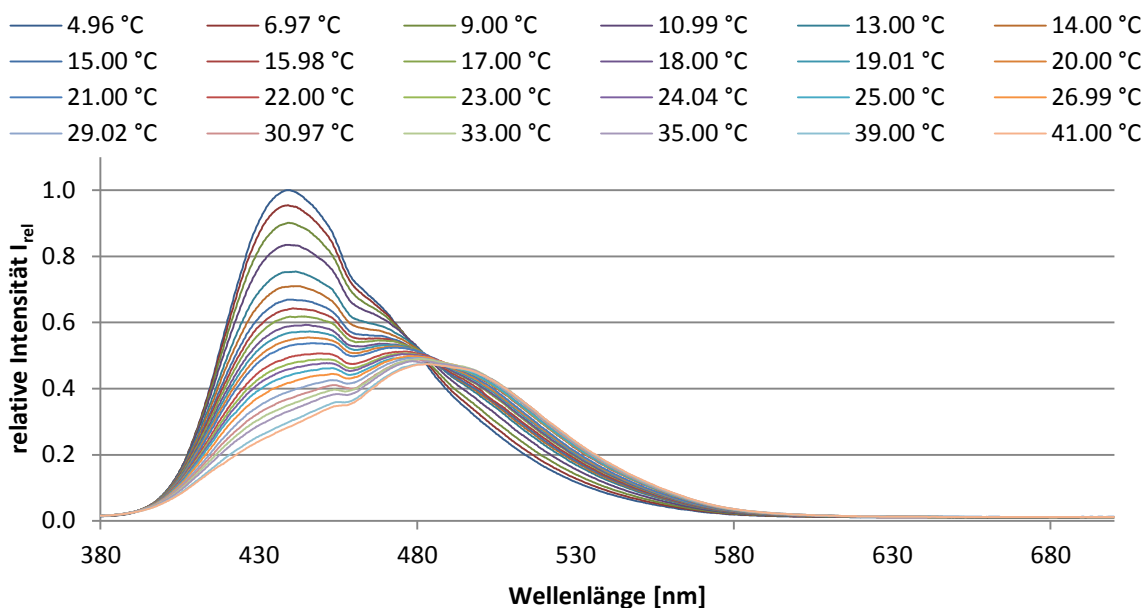


Abbildung 651: Temperaturabhängige Emissionsspektren von 1 % Laurdan (24) in 50 % DMPC - 50 % DPPC.

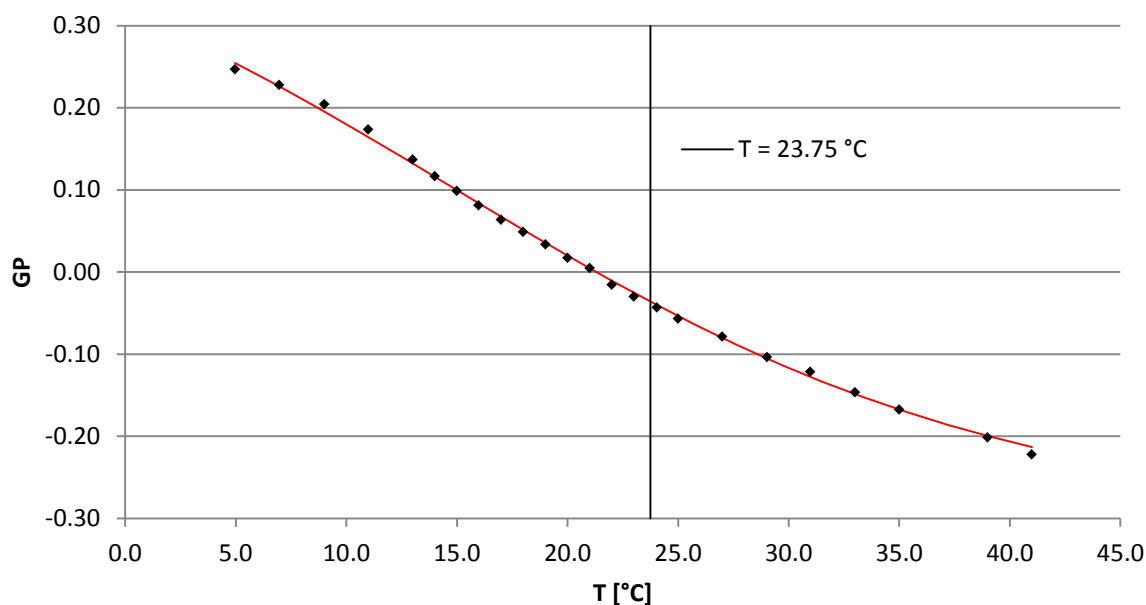


Abbildung 652: GP-Werte von 1 % Laurdan (24) in 50 % DMPC - 50 % DPPC als Funktion der Temperatur.

Tabelle 50: Charakteristische Werte für das System 50 % DMPC - 50 % DPPC.

50% DMPC/50% DPPC [T _c = 23.75 °C]																								
T[°C]	4,96	6,97	9,00	10,99	13,00	14,00	15,00	15,98	17,00	18,00	19,01	20,00	21,00	22,00	23,00	24,04	25,00	26,99	29,02	30,97	33,00	35,00	39,00	41,00
I[441 nm]	1,00	0,95	0,90	0,83	0,75	0,71	0,67	0,64	0,62	0,59	0,57	0,55	0,53	0,49	0,47	0,46	0,44	0,42	0,39	0,37	0,35	0,33	0,30	0,28
I[476 nm]	0,60	0,60	0,60	0,59	0,57	0,56	0,55	0,54	0,54	0,53	0,53	0,53	0,52	0,51	0,50	0,50	0,49	0,49	0,48	0,47	0,47	0,47	0,45	0,45
GP	0,25	0,23	0,20	0,17	0,14	0,12	0,10	0,08	0,06	0,05	0,03	0,02	0,00	-0,02	-0,03	-0,04	-0,06	-0,08	-0,10	-0,12	-0,15	-0,17	-0,20	-0,22
GP-Wert (Gelphase)	0,25		GP-Wert (fluide Phase)		Phasenkoexistenzgebiet												5-40 °C							

▪ **Liposomen mit 25 % DMPC- und 75 % DPPC-Anteil**

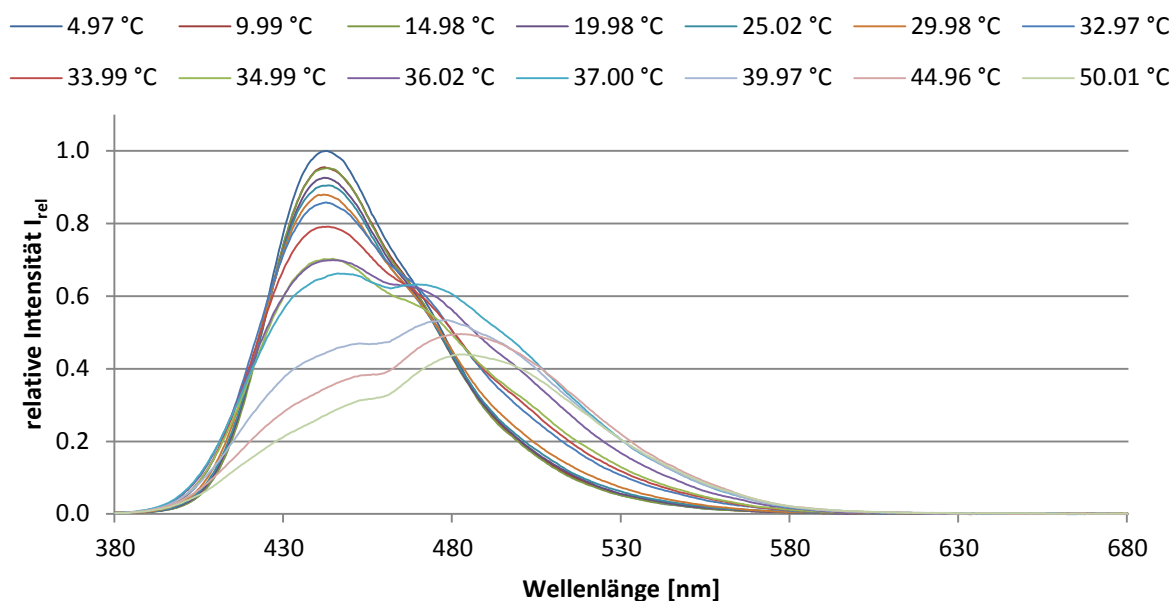


Abbildung 653: Temperaturabhängige Emissionsspektren von 1 % Laurdan (24) in 25 % DMPC - 75 % DPPC.

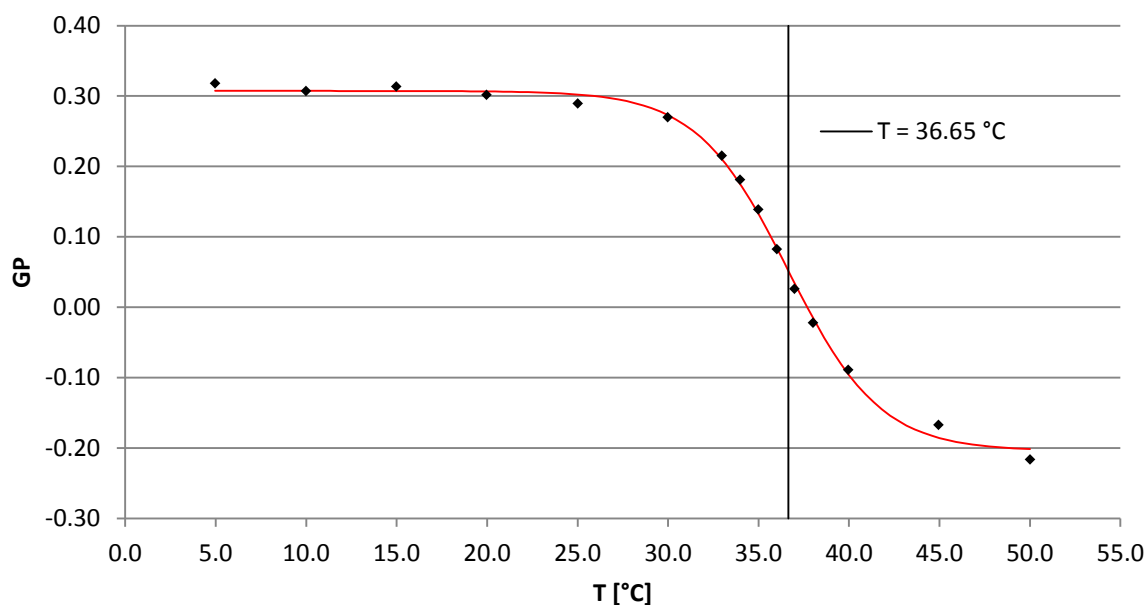


Abbildung 654: GP-Werte von 1 % Laurdan (24) in 25 % DMPC - 75 % DPPC als Funktion der Temperatur.

Tabelle 51: Charakteristische Werte für das System 25 % DMPC - 75 % DPPC.

25% DMPC/75% DPPC [$T_c = 36.65$ °C]															
T [°C]	4,97	9,99	14,98	19,98	25,02	29,98	32,97	33,99	34,99	36,02	37,00	38,02	39,97	44,96	50,01
I [442 nm]	1,00	0,95	0,95	0,93	0,90	0,88	0,86	0,79	0,70	0,70	0,65	0,64	0,45	0,35	0,27
I (476 nm)	0,52	0,51	0,50	0,50	0,50	0,51	0,55	0,55	0,53	0,59	0,62	0,67	0,53	0,49	0,42
GP	0,32	0,31	0,31	0,30	0,29	0,27	0,21	0,18	0,14	0,08	0,03	-0,02	-0,09	-0,17	-0,22
GP-Wert (Gelphase)	0,32		GP-Wert (fluide Phase)				-0,22		Phasenkoexistenzgebiet				30-45 °C		

▪ **Liposomen mit 10 % DMPC- und 90 % DPPC-Anteil**

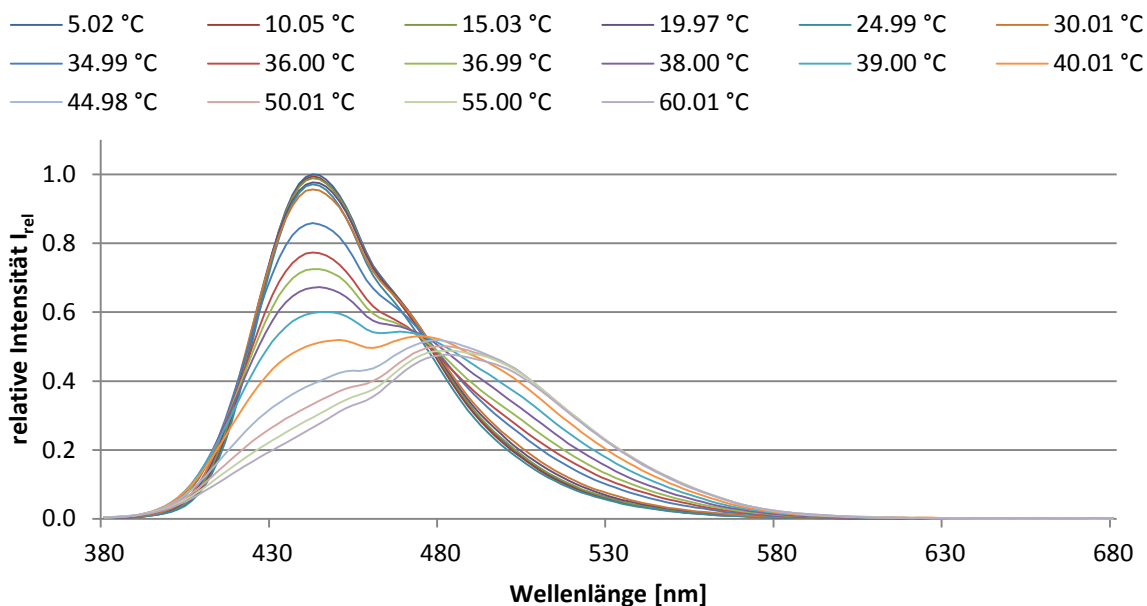


Abbildung 655: Temperaturabhängige Emissionsspektren von 1 % Laurdan (24) in 10 % DMPC - 90 % DPPC.

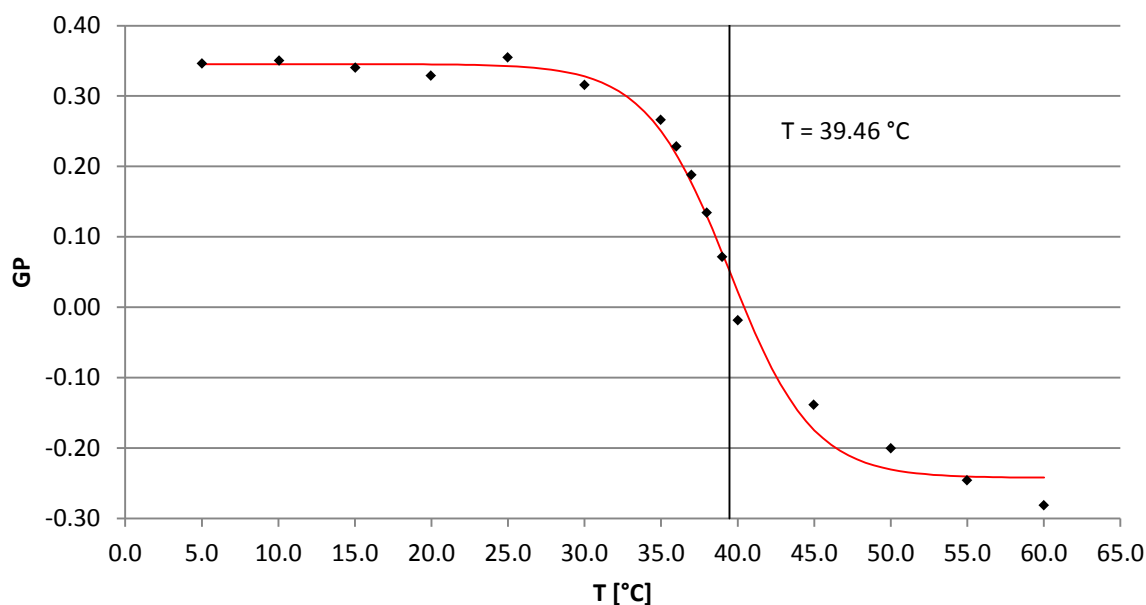


Abbildung 656: GP-Werte von 1 % Laurdan (24) in 10 % DMPC - 90 % DPPC als Funktion der Temperatur.

Tabelle 52: Charakteristische Werte für das System 10 % DMPC - 90 % DPPC.

10% DMPC/90% DPPC [$T_c = 39.46\text{ °C}$]																
T[°C]	5,02	10,05	15,03	19,97	24,99	30,01	34,99	36,00	36,99	38,00	39,00	40,01	44,98	50,01	55,00	60,01
I[441 nm]	1,00	0,99	0,99	0,98	0,97	0,96	0,86	0,77	0,73	0,67	0,60	0,51	0,39	0,33	0,29	0,26
I(476 nm)	0,49	0,48	0,49	0,49	0,46	0,50	0,50	0,49	0,50	0,51	0,52	0,53	0,52	0,50	0,49	0,47
GP	0,35	0,35	0,34	0,33	0,35	0,32	0,27	0,23	0,19	0,13	0,07	-0,02	-0,14	-0,20	-0,25	-0,28
GP-Wert (Gelpase)	0,35		GP-Wert (fluide Phase)		-0,28			Phasenkoexistenzgebiet			32-50 °C					

▪ Liposomen mit 100 % DPPC -Anteil

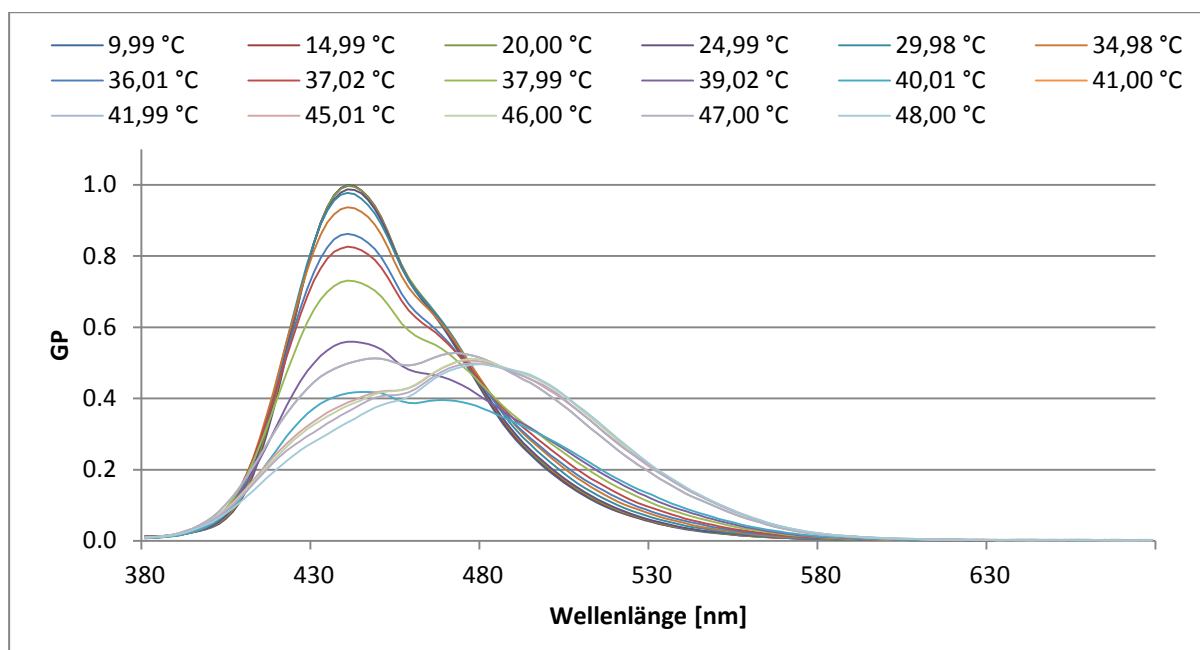


Abbildung 657: Temperaturabhängige Emissionsspektren von 1 % Laurdan (24) in 100 % DPPC.

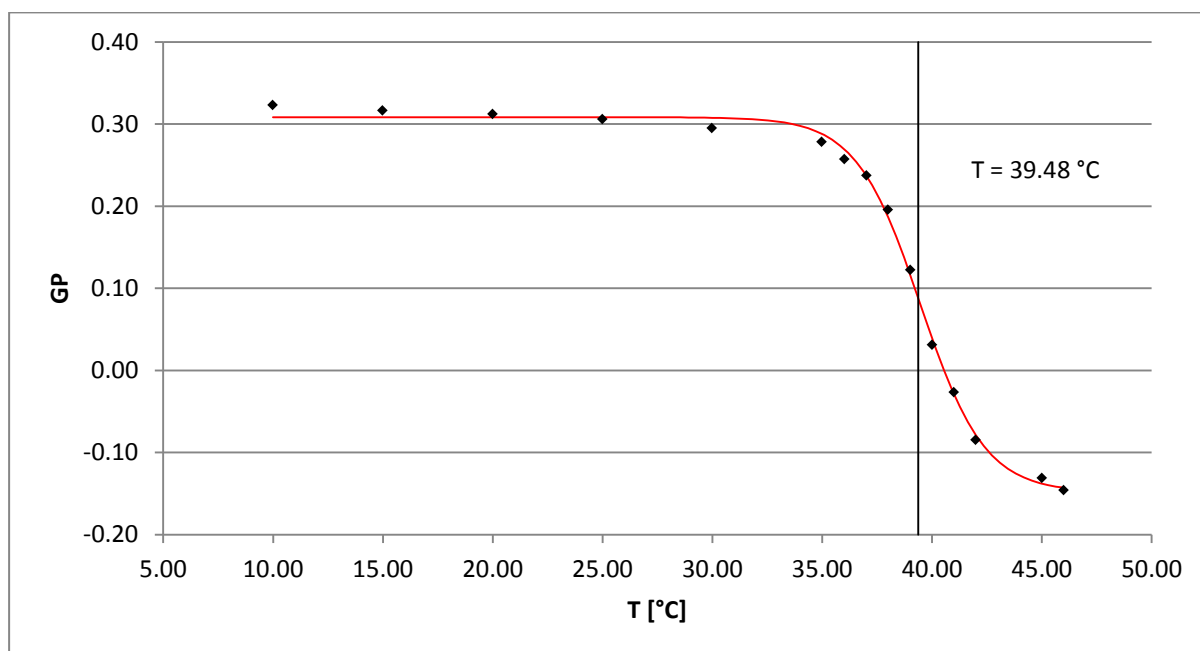


Abbildung 658: GP-Werte von 1 % Laurdan (24) in 100 % DPPC als Funktion der Temperatur.

Tabelle 53: Charakteristische Werte für das System 100 % DPPC.

100% DPPC [T _c = 39.48 °C]															
T[°C]	9,99	14,99	20,00	24,99	29,98	34,98	36,01	37,02	37,99	39,02	40,01	41,00	41,99	45,01	46,00
I[441 nm]	1,00	1,00	1,00	0,99	0,98	0,94	0,86	0,83	0,73	0,56	0,42	0,50	0,43	0,39	0,38
I[476 nm]	0,51	0,52	0,52	0,52	0,53	0,53	0,51	0,51	0,49	0,44	0,39	0,53	0,51	0,51	0,51
GP	0,32	0,32	0,31	0,31	0,30	0,28	0,26	0,24	0,20	0,12	0,03	-0,03	-0,08	-0,13	-0,15
GP-Wert (Gelphase)			0,32	GP-Wert (fluide Phase)			-0,15			Phasenkoexistenzgebiet				35-42 °C	

▪ Vergleich der unterschiedlichen Phospholipidmischungen

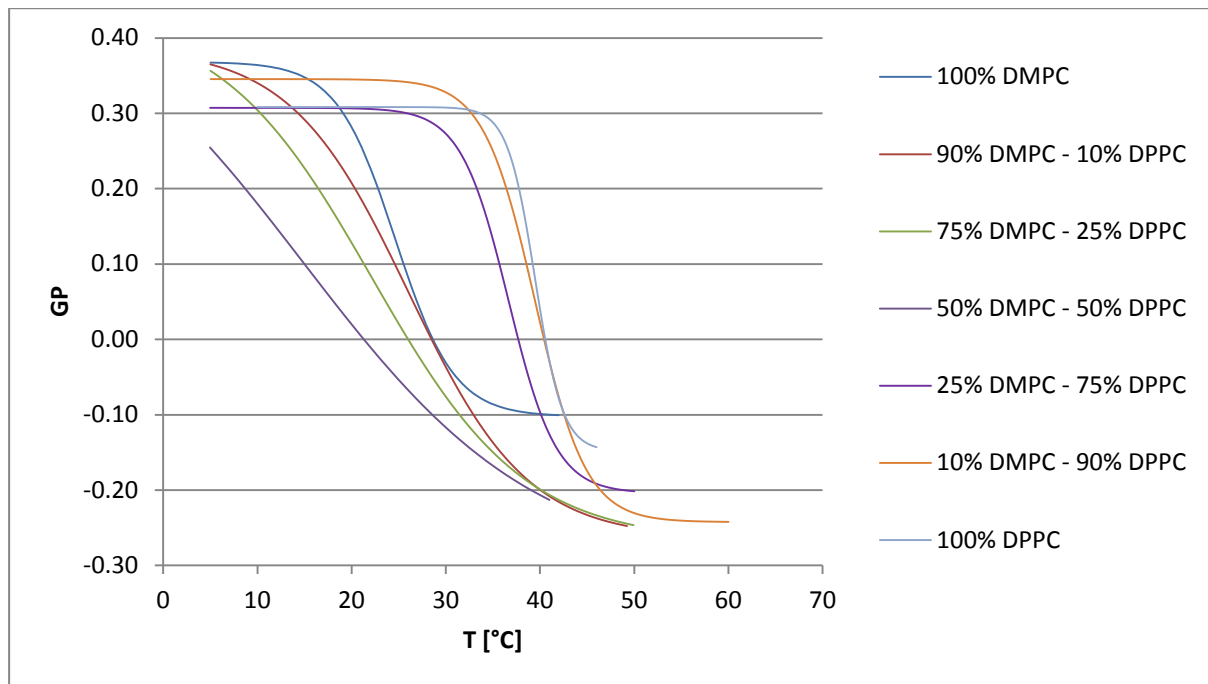


Abbildung 659: Vergleich des Phasenverhaltens der unterschiedlichen Phospholipidmischungen (GP vs. T).

Tabelle 54: Vergleich der charakteristischen Werte für die unterschiedlichen Phospholipidmischungen.

DMPC [%]	100	90	75	50	25	10	0
DPPC [%]	0	10	25	50	75	90	100
T_c [°C]	24.64	26.06	22.16	23.75	36.65	39.65	39.48
GP-Wert (Gelphase)	0.38	0.36	0.35	0.25	0.32	0.35	0.32
GP-Wert (fluide Phase)	-0.21	-0.26	-0.27	-0.22	-0.22	-0.28	-0.15
Phasenkoexistenzgebiet [°C]	13-34	10-45	10-47	5-40	30-45	32-50	35-42

5.10.2 Bestimmung der Phasenübergangstemperaturen dotierter DMPC/DPPC-Liposomen

▪ Liposomenpräparation und Fluoreszenzmessungen

Die Herstellung der mit **71, 73, 75, 93** und **94/88, 90, 95, 97** und **99** dotierten unilamellaren Liposomen (LUV's) erfolgte nach folgender Vorschrift:

Zur Herstellung unilamellarer Liposomen, bestehend aus einer Liposomenmatrix (DMPC/DPPC = 75 % - 25 %) und einer Dotierung mit 1.0 % Laurdan und 5 % bzw. 10 % der Membranbausteine **71, 73, 75, 93** und **94/88, 90, 95, 97** und **99** wurden 750 μL DMPC-Stammlösung ($c = 2 \text{ mmol/L}$), 250 μL DPPC-Stammlösung ($c = 2 \text{ mmol/L}$) 200 μL Laurdan-stammlösung ($c = 10^{-4} \text{ mol/L}$) und 1 mL der dimeren ($c = 10^{-4} \text{ mol/L}$) bzw. 2 mL der monomeren ($c = 10^{-4} \text{ mol/L}$) Membranbausteine in einen 10 mL Rundkolben gegeben. Das Lösungsmittelgemisch wurde am Rotationsverdampfer bis zu Trockne eingengt und anschließend gefriergetrocknet. Hierzu wurde der Kolben 10 min in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend min. 4 h lyophilisiert. Die resultierenden Filme, bestehend aus den Phosphatidylcholinen, der Fluoreszenzsonde Laurdan und den Membranbausteinen **71, 73, 75, 93** und **94/88, 90, 95, 97** und **99** wurden anschließend in 1 mL MES-Puffer (375 mmol, pH = 5.5) aufgenommen und für min. 1 min gevortext (Details: siehe 5.4). Die Liposomenlösung wurde mit Hilfe des LiposoFast Basic/Stabilisator[©]-Systems zur Herstellung unilamellarer Liposomen min. 19-mal (ungerade Extrusionzyklen) durch eine 200 nm Polycarbonatmembran extrudiert. Die so erhaltene wässrige unilamellare Liposomenlösung ($c = 2 \text{ mmol/L}$, Dotierung 1 % Laurdan (**24**), 5 % bzw 10 % Membranbaustein) wurde zur Vermessung am Fluoreszenzspektrometer bereitgehalten. Die Aufnahme der Fluoreszenzspektren und die Ermittlung der GP-Werte erfolgt wie unter 5.10 beschrieben.

5.10.2.1 Dotierung mit monomeren funktionalisierten Lithocholsäurederivaten

▪ 10 % Lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid (71) in DMPC/DPPC

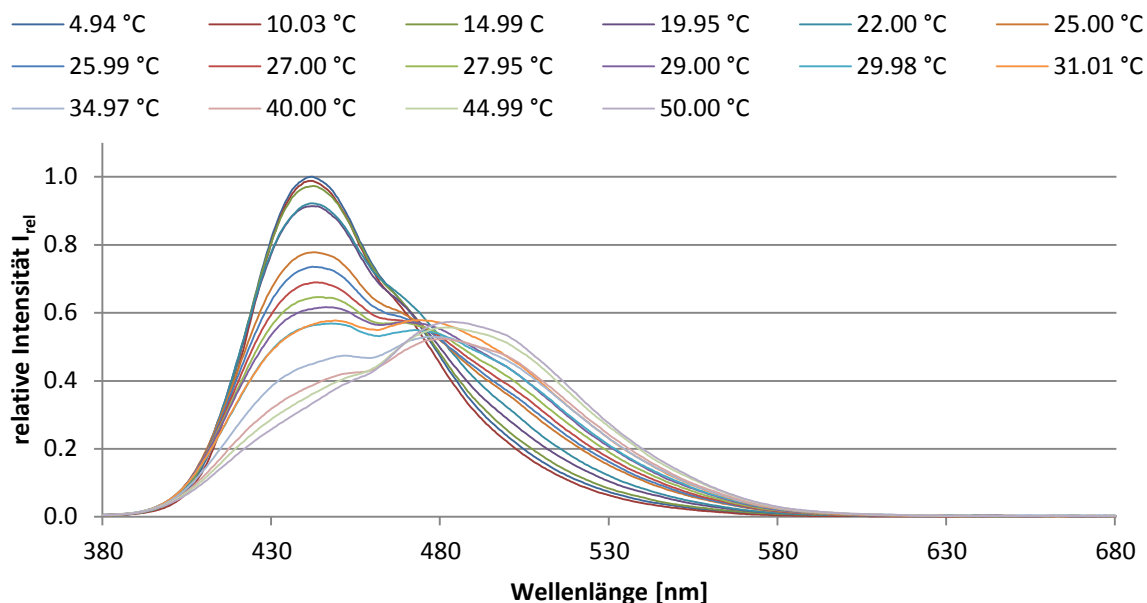


Abbildung 660: Temperaturabhängige Emissionsspektren von 1 % Laurdan (24) in 75 % DMPC - 25 % DPPC + 10 % Lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid (71).

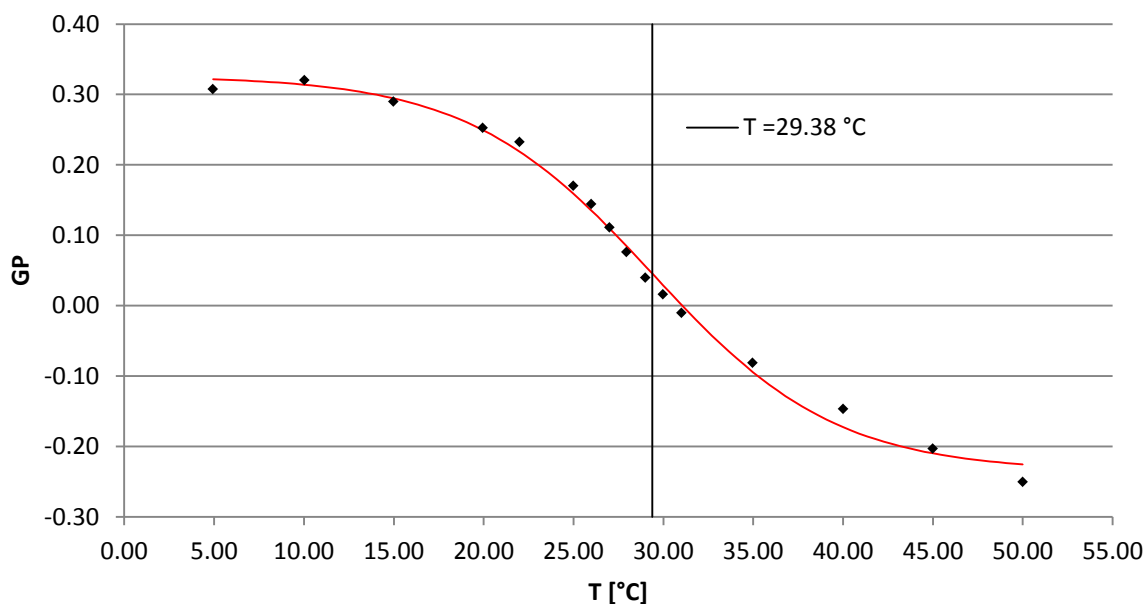


Abbildung 661: GP-Werte von 1 % Laurdan (24) in 75 % DMPC - 25 % DPPC + 10 % Lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid (71).

Tabelle 55: Charakteristische Werte für das System 75 % DMPC - 25 % DPPC + 10 % Lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid (71).

75% DMPC/25% DPPC + 10% LP-Amid [$T_c = 29.38$ °C]															
T [°C]	4,94	10,03	14,99	19,95	22,00	25,00	25,99	27,00	27,95	29,00	29,98	31,01	34,97	40,00	50,00
I[441 nm]	1,00	0,99	0,97	0,91	0,92	0,78	0,74	0,69	0,64	0,61	0,56	0,57	0,45	0,39	0,33
I(476 nm)	0,53	0,51	0,54	0,55	0,57	0,55	0,55	0,55	0,55	0,56	0,55	0,58	0,53	0,52	0,56
GP	0,31	0,32	0,29	0,25	0,23	0,17	0,14	0,11	0,08	0,04	0,02	-0,01	-0,08	-0,15	-0,25
GP-Wert (Gelphase)			0,31	GP-Wert (fluide Phase)				-0,25	Phasenkoexistenzgebiet					15-45 °C	

▪ 10 % Glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid 73 in DMPC/DPPC

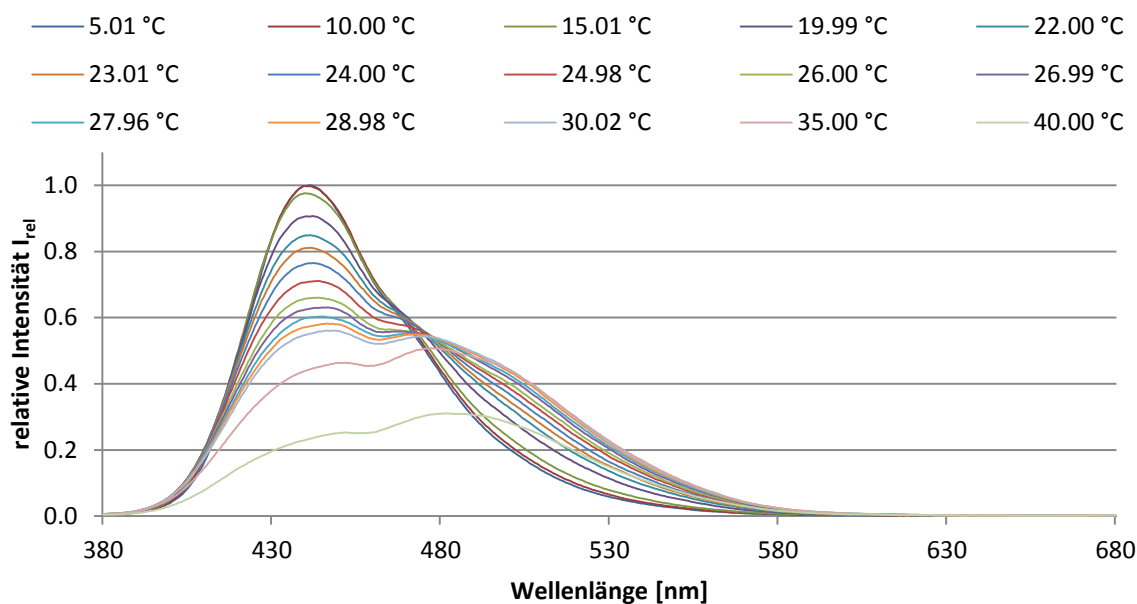


Abbildung 662: Temperaturabhängige Emissionsspektren von 1 % Laurdan (24) in 75 % DMPC - 25 % DPPC + 10 % Glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid 73.

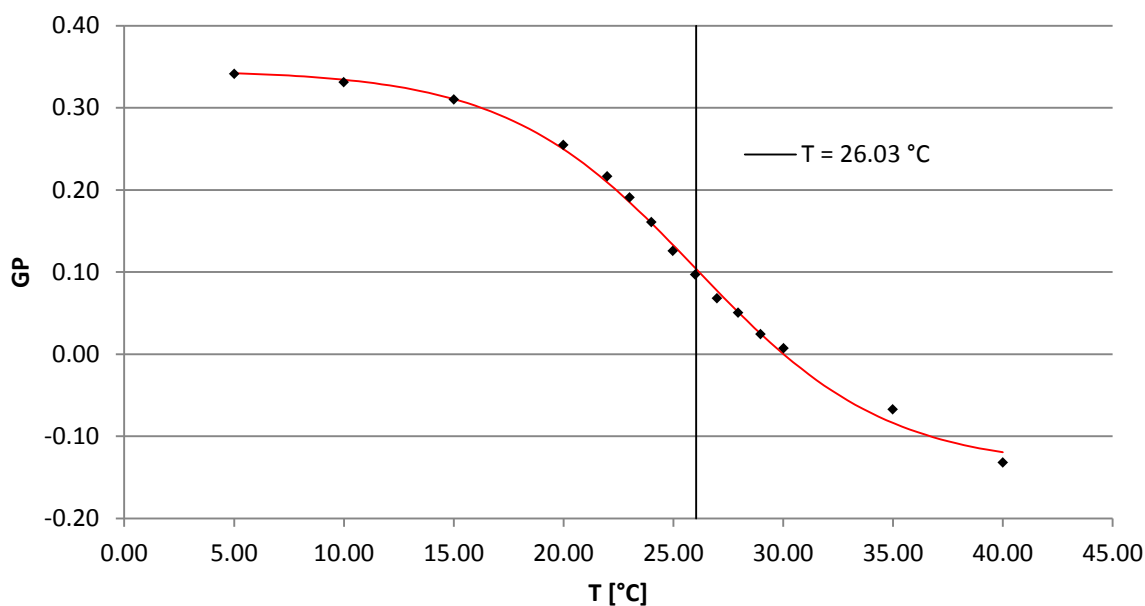


Abbildung 663: GP-Werte von 1 % Laurdan (24) in 75 % DMPC - 25 % DPPC + 10 % Glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid 73.

Tabelle 56: Charakteristische Werte für das System 75 % DMPC - 25 % DPPC + 10 % Glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid 73.

75% DMPC/25% DPPC + 10% H ₃ N-LP-Amid [T _c = 26.03 °C]															
T[°C]	5,01	10,00	15,01	19,99	22,00	23,01	24,00	24,98	26,00	26,99	27,96	28,98	30,02	35,00	40,00
I[441 nm]	1,00	1,00	0,98	0,91	0,85	0,81	0,76	0,71	0,66	0,63	0,60	0,57	0,55	0,44	0,23
I(476 nm)	0,49	0,50	0,51	0,54	0,55	0,55	0,55	0,55	0,54	0,55	0,54	0,55	0,54	0,51	0,30
GP	0,34	0,33	0,31	0,25	0,22	0,19	0,16	0,13	0,10	0,07	0,05	0,02	0,01	-0,07	-0,13
GP-Wert (Gelphase)	0,34		GP-Wert (fluide Phase)		-0,13		Phasenkoexistenzgebiet						10-40 °C		

▪ 10 % TFA-arginin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid 93 in DMPC/DPPC

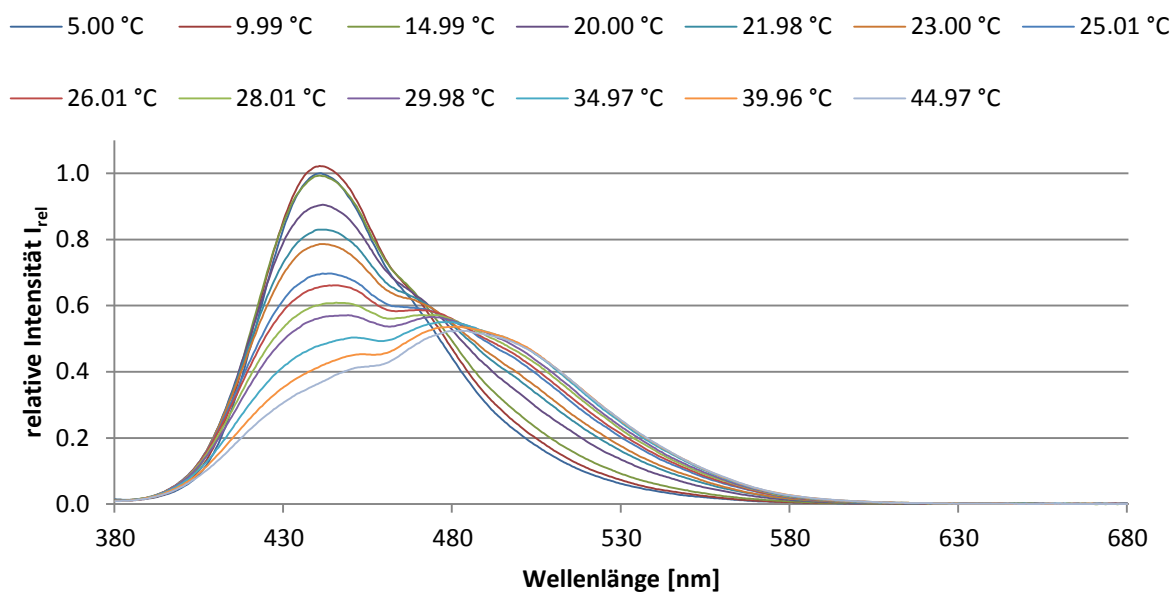


Abbildung 664: Temperaturabhängige Emissionsspektren von 1 % Laurdan (24) in 75 % DMPC - 25 % DPPC + 10 % TFA-arginin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid 93.

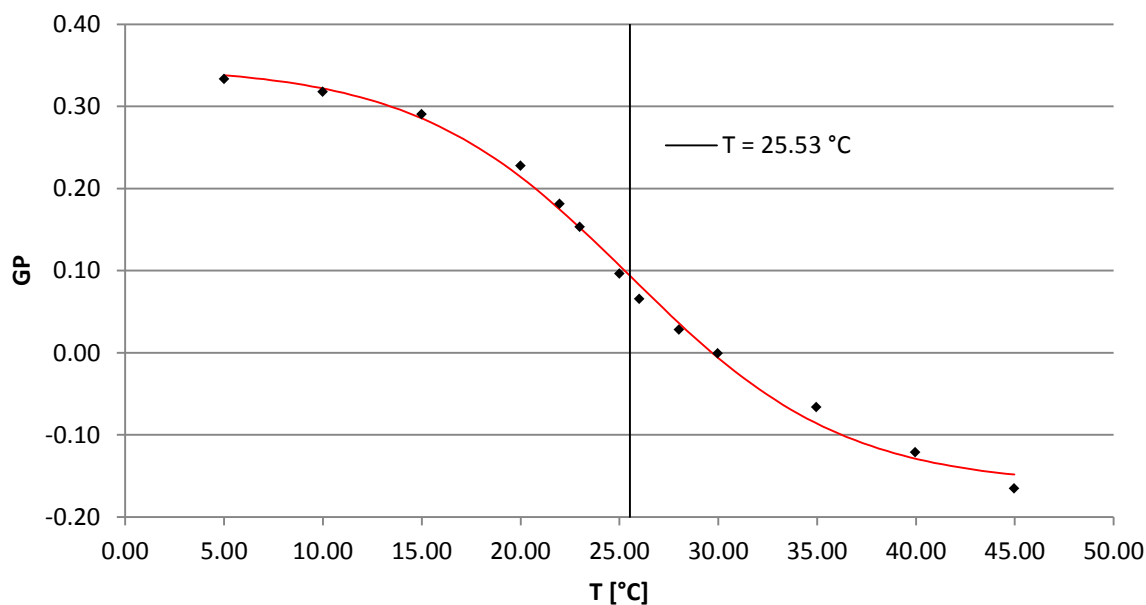


Abbildung 665: GP-Werte von 1 % Laurdan (24) in 75 % DMPC - 25 % DPPC + 10 % TFA-arginin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid 93.

Tabelle 57: Charakteristische Werte für das System 75 % DMPC - 25 % DPPC + 10 % Arginin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid 93.

75% DMPC/25% DPPC + 10% Arg-LP-Amid [$T_c = 25.53\text{ °C}$]													
T[°C]	5,00	9,99	14,99	20,00	21,98	23,00	25,01	26,01	28,01	29,98	34,97	39,96	44,97
I[441 nm]	1,00	1,02	0,99	0,90	0,83	0,79	0,70	0,66	0,60	0,56	0,48	0,42	0,37
I(476 nm)	0,50	0,53	0,55	0,57	0,58	0,58	0,57	0,58	0,57	0,56	0,55	0,53	0,51
GP	0,33	0,32	0,29	0,23	0,18	0,15	0,10	0,07	0,03	0,00	-0,07	-0,12	-0,17
GP-Wert (Gelphase)			0,33	GP-Wert (fluide Phase)			-0,17	Phasenkoexistenzgebiet			10-40°		

▪ 10 % TFA-arginin-*N*-glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid 94 in DMPC/DPPC

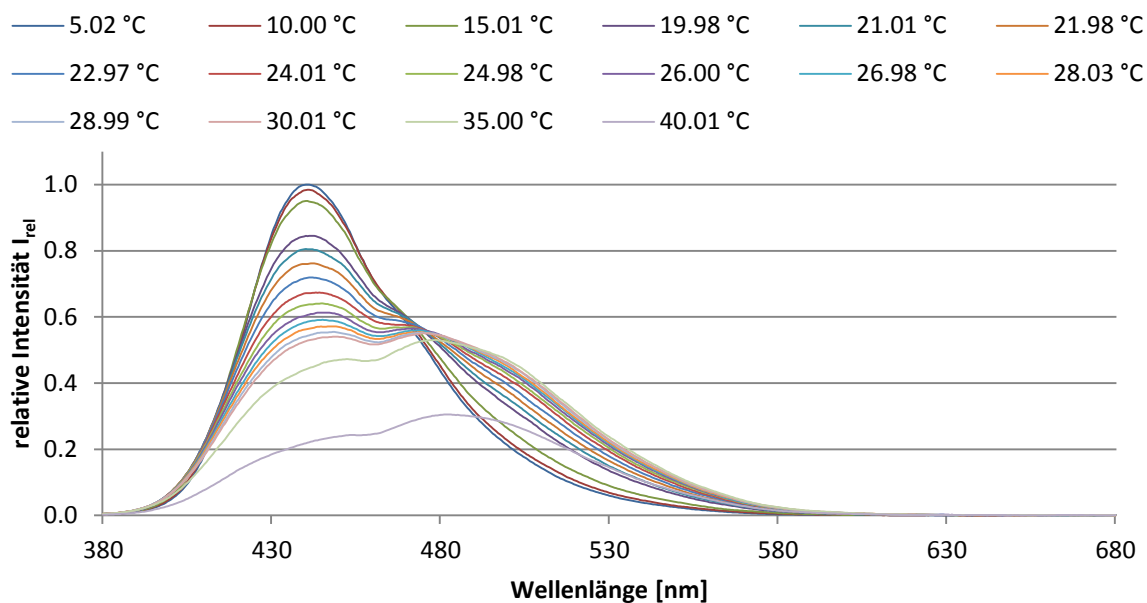


Abbildung 666: Temperaturabhängige Emissionsspektren von 1 % Laurdan (24) in 75 % DMPC - 25 % DPPC + 10 % TFA-arginin-*N*-glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid 94.

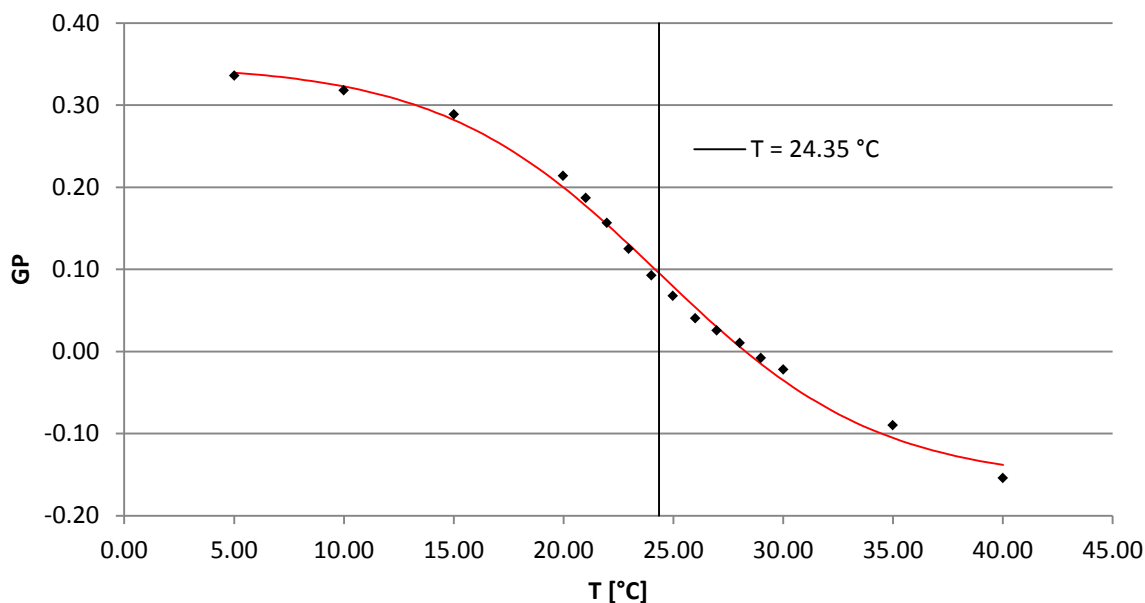


Abbildung 667: GP-Werte von 1 % Laurdan (24) in 75 % DMPC - 25 % DPPC + 10 % TFA-arginin-*N*-glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid 94.

Tabelle 58: Charakteristische Werte für das System 75 % DMPC - 25 % DPPC + 10 % TFA-arginin-*N*-glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid 94.

75% DMPC/25% DPPC + 10% Arg-gly-LP-Amid [$T_c = 24.35\text{ °C}$]																
$T[\text{°C}]$	5,02	10,00	15,01	19,98	21,01	21,98	22,97	24,01	24,98	26,00	26,98	28,03	28,99	30,01	35,00	40,01
$I[441\text{nm}]$	1,00	0,98	0,95	0,84	0,81	0,76	0,72	0,67	0,64	0,60	0,58	0,56	0,54	0,53	0,44	0,22
$I(476\text{ nm})$	0,50	0,51	0,52	0,55	0,55	0,55	0,56	0,56	0,56	0,56	0,56	0,55	0,55	0,55	0,53	0,30
GP	0,34	0,32	0,29	0,21	0,19	0,16	0,12	0,09	0,07	0,04	0,03	0,01	-0,01	-0,02	-0,09	-0,15
GP-Wert (Gelphase)	0,34		GP-Wert (fluide Phase)		-0,15		Phasenkoexistenzgebiet								10-40 °C	

▪ 10 % BP(OLi)₂-lithocholsäure-N-methylpropargylamid 75 in DMPC/DPPC

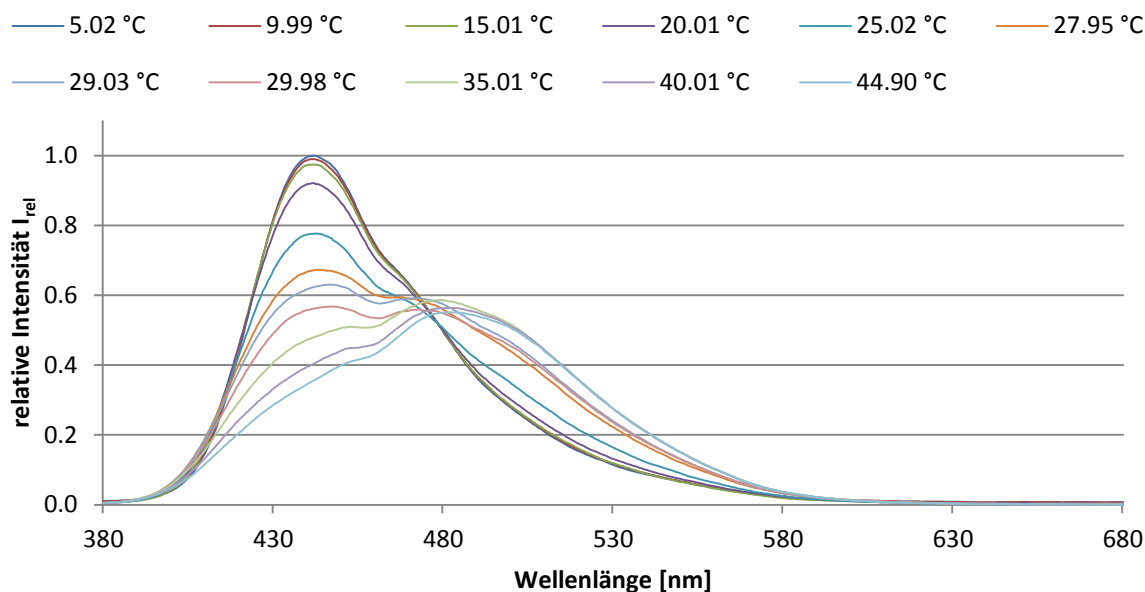


Abbildung 668: Temperaturabhängige Emissionsspektren von 1 % Laurdan (24) in 75 % DMPC - 25 % DPPC + 10 % BP(OLi)₂-lithocholsäure-N-methylpropargylamid 75.

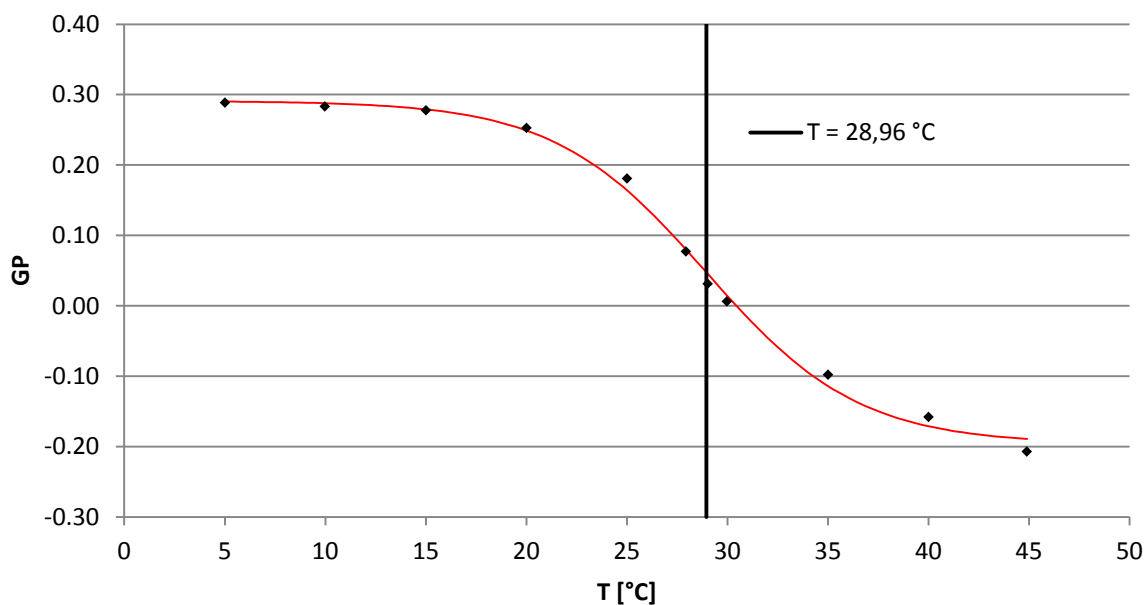


Abbildung 669: GP-Werte von 1 % Laurdan (24) in 75 % DMPC - 25 % DPPC + 10 % BP(OLi)₂-lithocholsäure-N-methylpropargylamid 75.

Tabelle 59: Charakteristische Werte für das System 75 % DMPC - 25 % DPPC + 10 % BP(OLi)₂-lithocholsäure-N-methylpropargylamid 75.

75% DMPC/25% DPPC + 10% BP(OLi) ₂ -LP-Amid [T _c = 28.96 °C]											
T[°C]	5,02	9,99	15,01	20,01	25,02	27,95	29,03	29,98	35,01	40,01	44,90
I[441 nm]	1,00	0,99	0,97	0,92	0,78	0,67	0,62	0,56	0,48	0,41	0,36
I(476 nm)	0,55	0,55	0,55	0,55	0,54	0,58	0,59	0,55	0,58	0,56	0,54
GP	0,29	0,28	0,28	0,25	0,18	0,08	0,03	0,01	-0,10	-0,16	-0,21
GP-Wert (Gelphase)			0,29	GP-Wert (fluide Phase)				-0,21	Phasenkoex.		20-40°

- Vergleich der monomeren funktionalisierten Lithocholsäure-Derivate bezüglich des Phasenverhaltens von DMPC/DPPC-Liposomen

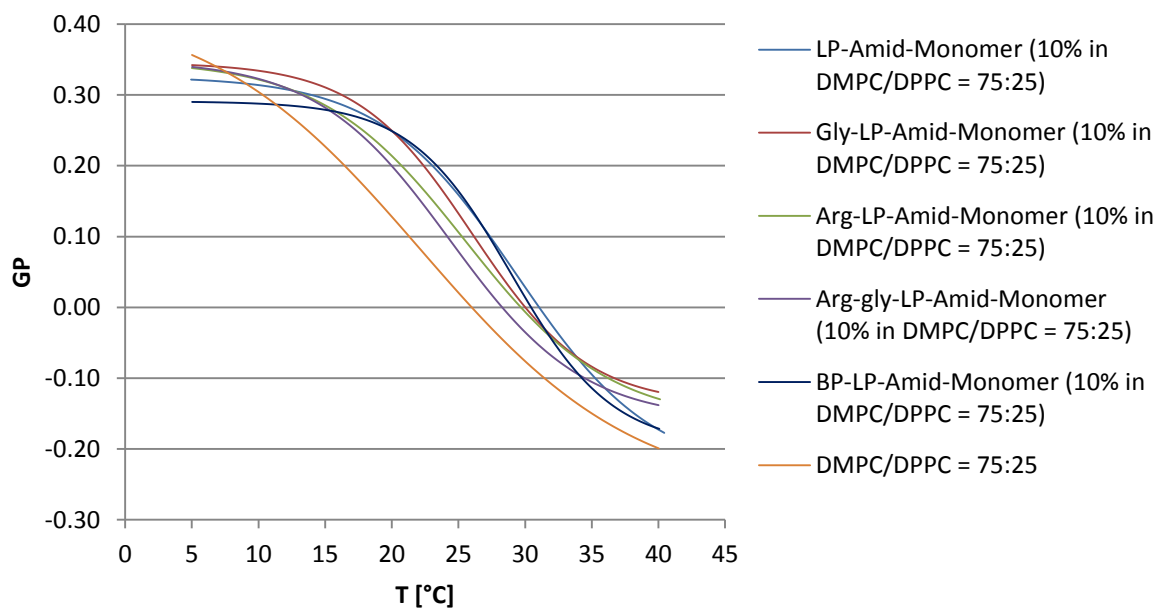


Abbildung 670: Gegenüberstellung der mit monomeren, funktionalisierten Lithocholsäure-Derivaten dotierten DMPC/DPPC-Liposomen (75 % - 25 %).

Tabelle 60: Charakteristische Werte der mit monomeren, funktionalisierten Lithocholsäure-Derivaten dotierten DMPC/DPPC-Liposomen (75 % - 25 %).

	DMPC/DPPC	LP-Amid	H ₂ N-LP-Amid	Arg-LP-Amid	Arg-gly-LP-Amid	BP(Oli) ₂ -LP-Amid
Dotierung [10 %]	75 %/25 %	71	73	93	94	75
T _c [°C]	22.16	29.38	26.03	25.53	24.35	28.96
GP-Wert (Gelphase)	0.35	0.31	0.34	0.33	0.34	0.29
GP-Wert (fluide Phase)	-0.27	-0.25	-0.13	-0.17	-0.15	-0.21
Phasenkoexistenzgebiet [°C]	10-47	15-45	10-40	10-40	10-40	20-40

5.10.2.2 Dotierung mit dimeren funktionalisierten Lithocholsäurederivaten

■ 5 %TFA-arginin-lithocholsäure-N-methylpropargylamid-Dimer97 in DMPC/DPPC

— 4.94 °C — 10.02 °C — 14.97 °C — 20.02 °C — 21.02 °C — 21.99 °C
 — 22.98 °C — 24.01 °C — 25.02 °C — 26.02 °C — 29.00 °C — 30.99 °C
 — 33.00 °C — 35.00 °C — 39.02 °C — 43.00 °C — 47.00 °C

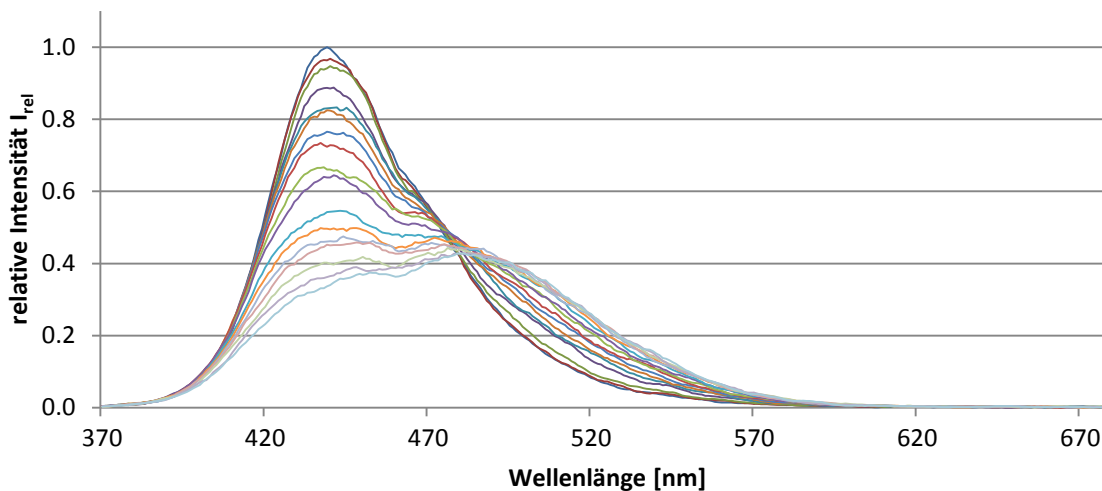


Abbildung 671: Temperaturabhängige Emissionsspektren von 1 % Laurdan (24) in 75 % DMPC - 25 % DPPC + 5 % TFA-arginin-lithocholsäure-N-methylpropargylamid-Dimer 97.

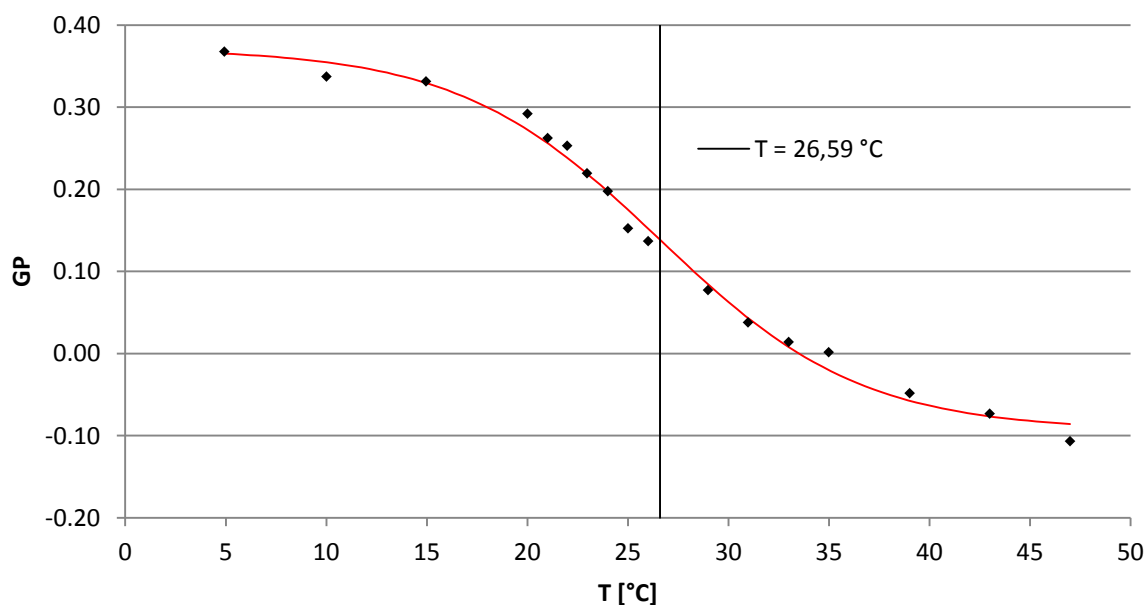


Abbildung 672: GP-Werte von 1 % Laurdan (24) in 75 % DMPC - 25 % DPPC + 5 % Arginin-lithocholsäure-N-methylpropargylamid-Dimer 97.

Tabelle 61: Charakteristische Werte für das System 75 % DMPC - 25 % DPPC + 5 % Arginin-lithocholsäure-N-methylpropargylamid-Dimer 97.

75% DMPC/25% DPPC + 5% Arg-LP-Amid-Dimer [T _c = 26.59 °C]																		
T[°C]	4,94	10,02	14,97	20,02	21,01	21,99	22,98	24,01	25,02	26,02	29,00	30,99	33,00	35,00	39,02	43,00	47,00	
I[441 nm]	1,00	0,96	0,94	0,89	0,83	0,83	0,77	0,72	0,66	0,64	0,54	0,50	0,46	0,45	0,40	0,36	0,34	
I[476 nm]	0,46	0,48	0,47	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49	0,48	0,46	0,46	0,45	0,45	0,44	0,42	0,42	
GP	0,37	0,34	0,33	0,29	0,26	0,25	0,22	0,20	0,15	0,14	0,08	0,04	0,01	0,00	-0,05	-0,07	-0,11	
GP-Wert (Gelphase)			0,37		GP-Wert (fluide Phase)			-0,11		Phasenkoexistenzgebiet						15-43 °C		

▪ 5 % TFA-arginin-*N*-glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer 99 in DMPC/DPPC

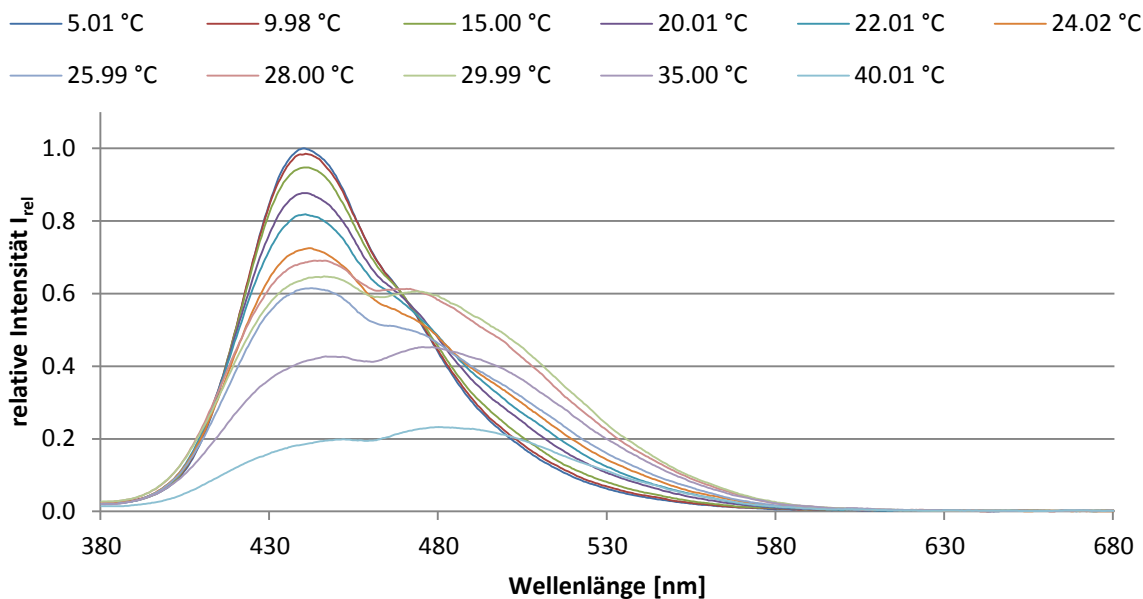


Abbildung 673: Temperaturabhängige Emissionsspektren von 1 % Laurdan (24) in 75 % DMPC - 25 % DPPC + 5 % TFA-arginin-*N*-glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer 99.

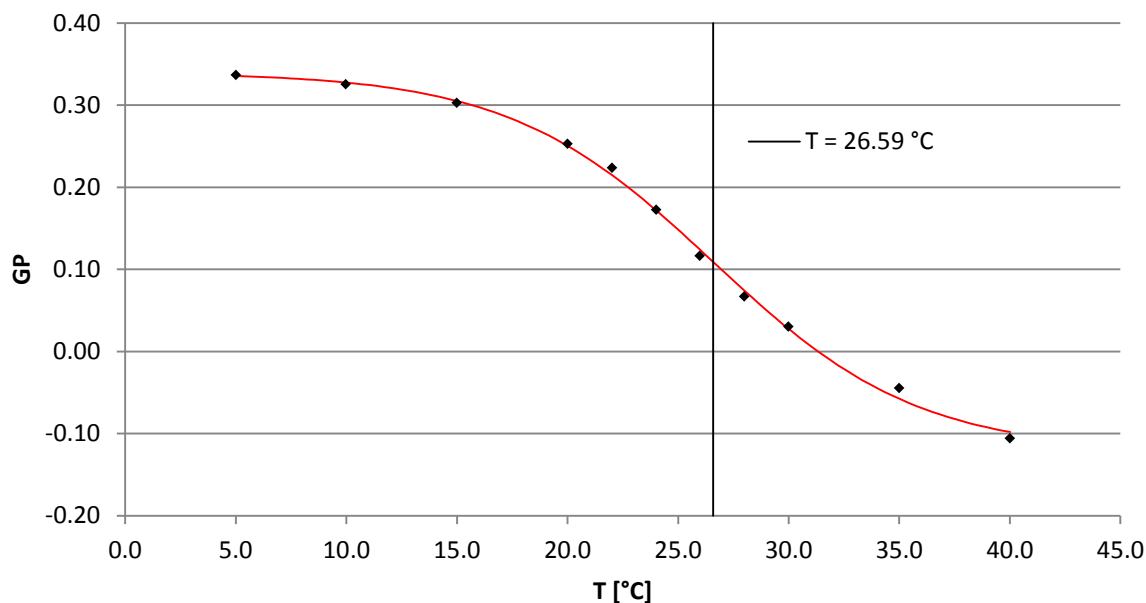


Abbildung 674: GP-Werte von 1% Laurdan (24) in 75 % DMPC - 25 % DPPC + 5 % TFA-arginin-*N*-glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer 99.

Tabelle 62: Charakteristische Werte für das System 75 % DMPC - 25 % DPPC + TFA-arginin-*N*-glycin-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer 99.

75% DMPC/25% DPPC + 5% Arg-gly-LP-Amid-Dimer [$T_c = 26.59^\circ\text{C}$]											
T[°C]	5,01	9,98	15,00	20,01	22,01	24,02	25,99	28,00	29,99	35,00	40,01
I[441 nm]	1,00	0,98	0,95	0,88	0,82	0,72	0,61	0,68	0,64	0,41	0,19
I(476 nm)	0,50	0,50	0,51	0,52	0,52	0,51	0,49	0,60	0,60	0,45	0,23
GP	0,34	0,33	0,30	0,25	0,22	0,17	0,12	0,07	0,03	-0,04	-0,11
GP-Wert (Gelphase)	0,34		GP-Wert (fluide Phase)		-0,11		Phasenkoex.		15-40°		

▪ 5% BP(OLi)₂-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer 90 in DMPC/DPPC

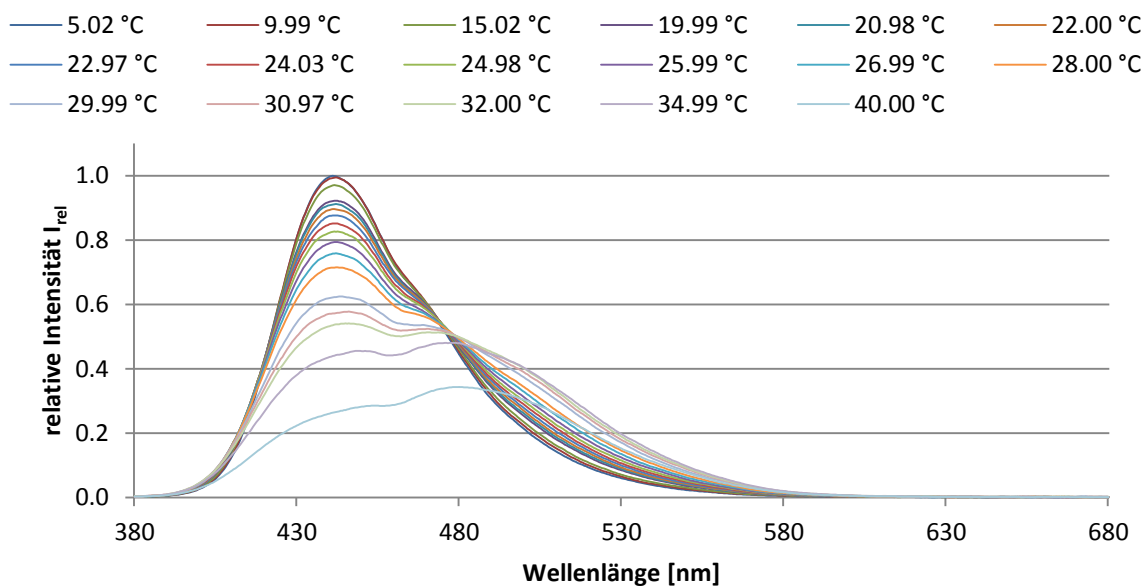


Abbildung 675: Temperaturabhängige Emissionsspektren von 1 % Laurdan (24) in 75 % DMPC - 25 % DPPC + 5 % BP(OLi)₂-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer 90.

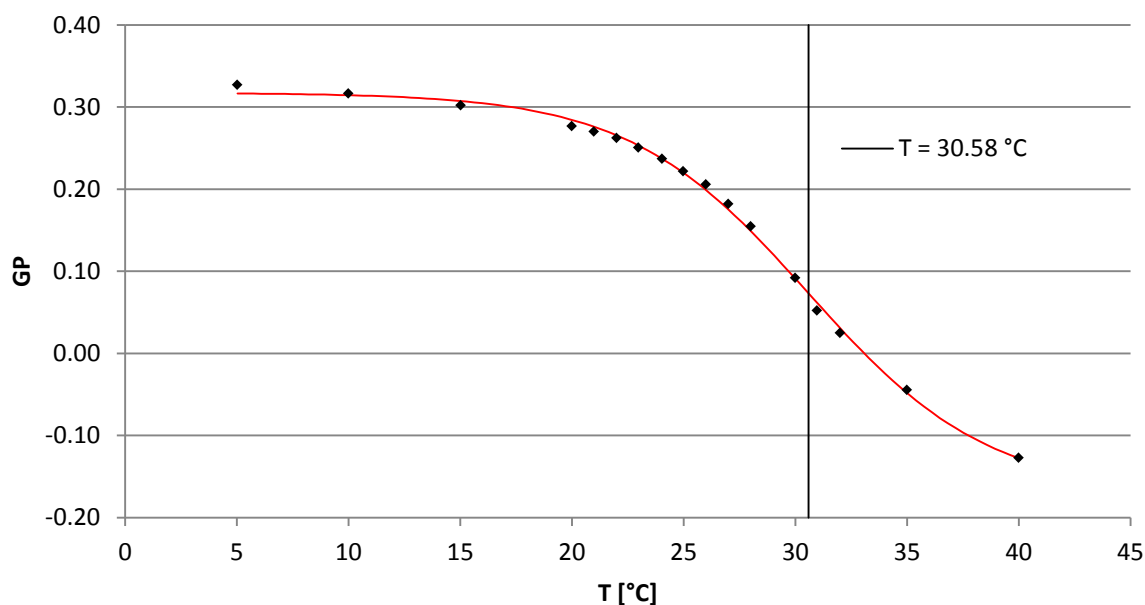


Abbildung 676: GP-Werte von 1 % Laurdan (24) in 75 % DMPC - 25 % DPPC + 5 % BP(OLi)₂-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer 90.

Tabelle 63: Charakteristische Werte für das System 75 % DMPC - 25 % DPPC + BP(OLi)₂-lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Dimer 90.

75% DMPC/25% DPPC + 5% BP(OLi)2-LP-Amid-Dimer [T _C = 30.58 °C]																		
T[°C]	5,02	9,99	15,02	19,99	20,98	22,00	22,97	24,03	24,98	25,99	26,99	28,00	29,99	30,97	32,00	34,99	40,00	
I[441 nm]	1,00	0,99	0,97	0,92	0,91	0,90	0,88	0,85	0,83	0,79	0,76	0,71	0,62	0,57	0,54	0,44	0,26	
I[476 nm]	0,51	0,52	0,52	0,52	0,52	0,52	0,53	0,53	0,53	0,52	0,52	0,52	0,52	0,52	0,51	0,48	0,34	
GP	0,33	0,32	0,30	0,28	0,27	0,26	0,25	0,24	0,22	0,21	0,18	0,15	0,09	0,05	0,03	-0,04	-0,13	
GP-Wert (Gelphase)			0,33	GP-Wert (fluide Phase)			-0,13	Phasenkoexistenzgebiet								20-40 °C		

- Vergleich der dimeren funktionalisierten Lithocholsäure-Derivate bezüglich des Phasenverhaltens von DMPC/DPPC-Liposomen

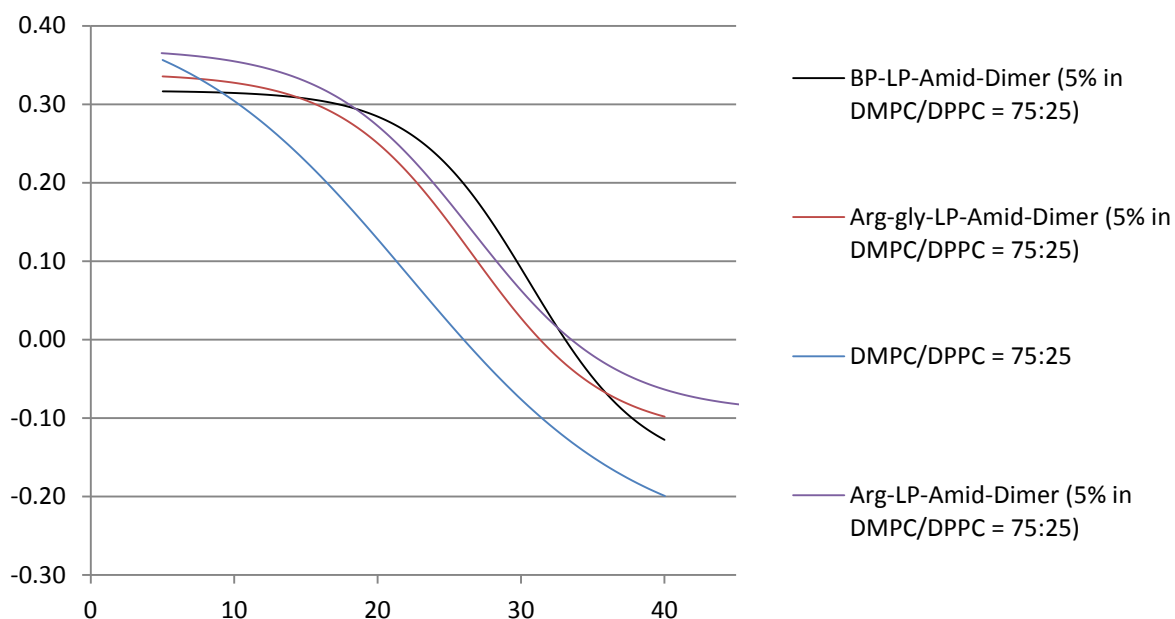


Abbildung 677: Gegenüberstellung der mit dimeren funktionalisierten Lithocholsäure-Derivaten dotierten DMPC/DPPC-Liposomen (75 %/25 %).

Tabelle 64: Charakteristische Werte der mit dimeren funktionalisierten Lithocholsäure-Derivaten dotierten DMPC/DPPC-Liposomen (75 %/25 %).

	DMPC/DPPC	LP-Amid	H ₂ N-LP-Amid	Arg-LP-Amid	Arg-gly-LP-Amid	BP(OLi) ₂ -LP-Amid
Dotierung [5 %]	75 %/25 %	95	88	97	99	90
T_c [°C]	22.16	30.38	27.05	26.59	26.59	30.38
GP-Wert (Gelphase)	0.35	0.32	0,36	0.37	0.34	0.33
GP-Wert (fluide Phase)	-0.27	-0.21	-0.14	-0.11	-0.11	-0.13
Phasenkoexistenzgebiet [°C]	10-47	15-45	10-40	10-40	15-45	20-40

- Vergleich der monomeren und dimeren funktionalisierten Lithocholsäure-Derivate bezüglich des Phasenverhaltens von DMPC/DPPC-Liposomen

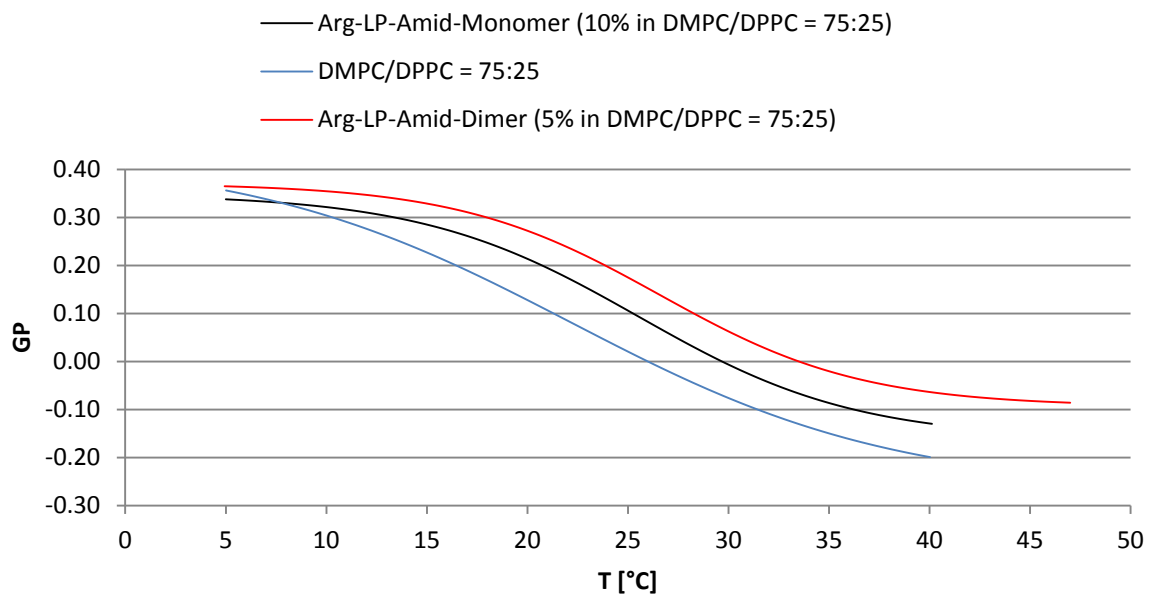


Abbildung 678: Vergleich des Phasenverhaltens 93- und 97-dotierter DMPC/DPPC-Liposomen.

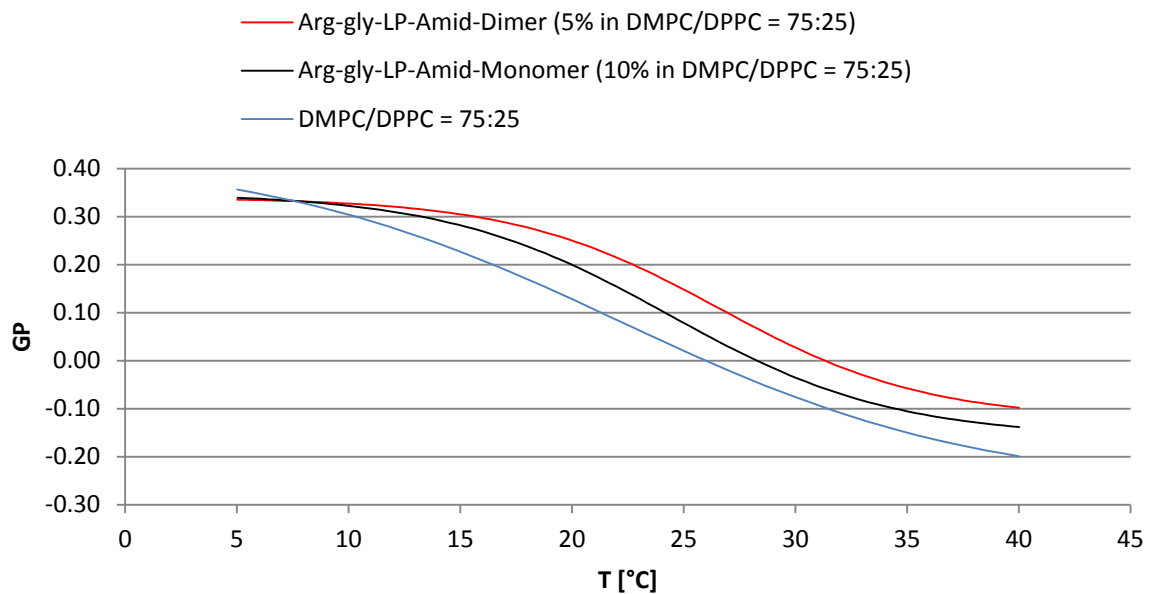


Abbildung 679: Vergleich des Phasenverhaltens 94- und 99-dotierter DMPC/DPPC-Liposomen.

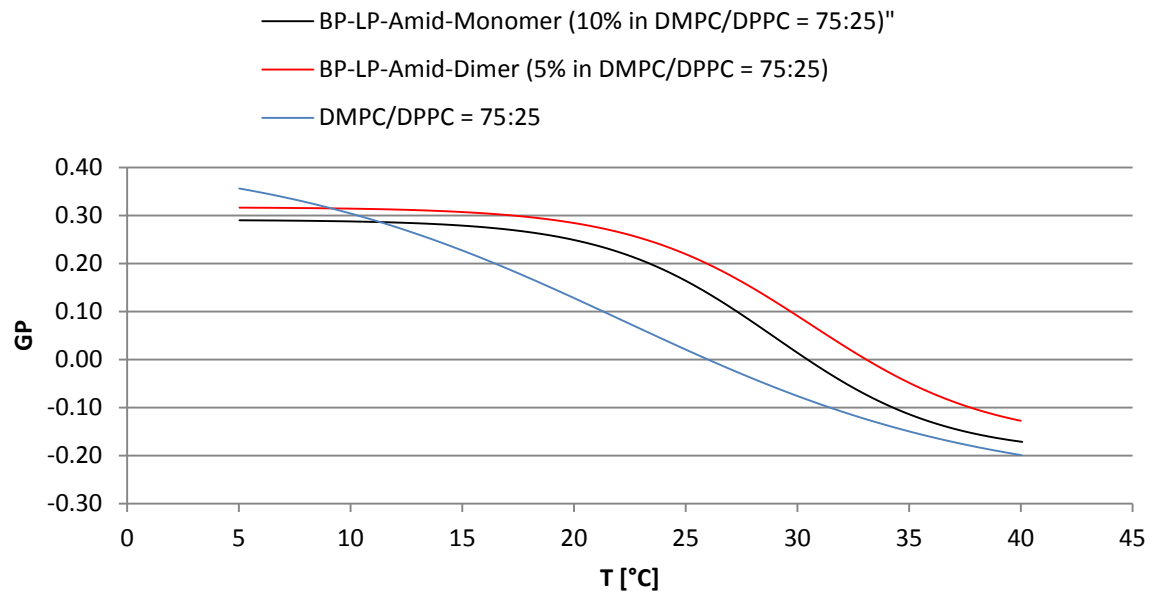


Abbildung 680: Vergleich des Phasenverhaltens 75- und 90-dotierter DMPC/DPPC-Liposomen.

6 Abkürzungsverzeichnis

A

abs.....	Absolut
AC.....	
.....	Adeninzyklase
AcOH	Essigsäure
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
Ar	Aromat
Arg.....	L-Arginin
Asn	L-Asparagin
Asp	L-Asparaginsäure
ATP.....	Adenosintriphosphat

B

BIPM.....	N-(p-(2-benzimidazolyl)phenyl)maleinimid
Boc	tert-Butyloxycarbonyl
Boc ₂ O.....	Di-tert-Butyldicarbonat
BP	3,5-Bis-(dimethylphosphorylmethyl)benzoesäure

C

cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
Cl-HOBt	6-Chloro-1-Hydroxy-1H-Benzotriazol
CMC	kritische Micellbildungskonzentration
COSY.....	Correlation Spectroscopy
CT	Charge-Transfer

D

Dabcyl.....	4-((4-(dimethylamino)-phenyl)azo)benzoesäure
DC.....	
.....	Dünnschichtchromatographie
DCC.....	Dicyclohexylcarbodiimid
DCM.....	Dichlormethan
DCU	Dicyclohexylurea (engl. Dicyclohexylharnstoff)
DEPT	Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer
DET.....	Diethylentriamin-trihydrochlorid
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIEA.....	N-Diisopropylethylendiamin
DMAP	4-N,N'-Dimethylaminopyridin
DMF	N,N'-Dimethylformamid

DMSO	Dimethylsulfoxid
DMPC	Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylcholin
DPPC	Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylcholin
DSC	Differential Scanning Calorimetry
DTNB	5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure

E

EDC	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N</i> '-ethylcarbodiimid
EDA	Ethylendiamin
EE	Ethylacetat
eq.	Äquivalente
ESI	Elektronenspray Ionisation
<i>et al.</i>	<i>lat.</i> und andere
Ex	Excitation

F

Fmoc	(9-Fluorenylmethyl)oxycarbonyl
FAB	<i>fast atom bombardement</i>
F _p	Schmelzpunkt
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer

G

GDP	Guanosindiphosphat
Gly	Glycin
GP	<i>Generalized Polarisation</i> (Verallgemeinerte Polarisation)
GPCR	G-protein-coupled-receptor
GTP	Guanosintriphosphat

H

HCTU	5-Chloro-1-[bis(dimethylamino)methylen]-1H-benzotriazolium-3-oxid hexafluorophosphat
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HOBt	1-Hydroxybenztriazol
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry

I

IR Infrarot

KK_a Bindungskonstante**L**

LUV Large Unilamellar Vesicles

Lys
..... L-Lysin**M**

M Molekül (bei Massenspektrometrie)

..... Molar (bei Bindungskonstanten)

MES Morpholinoethansulfonsäure

MLV Multilamellar Large Vesicles

MW Molekulargewicht

MS
..... Massenspektrometrie**N**

NMR Nuclear Magnetic Resonance

NOESY Nuclear Overhauser Enhancement spectroscopy

P

p.a. per analysis

PC Polycarbonat

Ph Phenylgruppe

PHT Parathrin

ppm parts per million

PTS para-Toluolsulfonsäure

RR_f ratio of front (relative Laufhöhe)

RT Raumtemperatur

S

Ser <i>L</i> -Serin
SUV Small Unilamellar Vesicles

T

T3 Triiodthyronin
T4 Thyroxin
T _C Phasenübergangstemperatur
TEA..... Triethylamin
TFA..... Trifluoressigsäure
THF..... Tetrahydrofuran
TMEDA..... <i>N,N,N',N'</i> -Tetraethylendiamin
TREN..... Triethylentetramin
Trp <i>L</i> -Tryptophan
Tyr <i>L</i> -Tyrosin

U

UV/Vis Absorptionsspektroskopie
--------------	--------------------------------

7 Literaturverzeichnis

- [1] D. Voet, *Lehrbuch der Biochemie*, Wiley-VCH Verlag, **2002**.
 - [2] <http://www.nobel.se>.
 - [3] T. Schrader, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1996**, 35, 2649.
 - [4] A. G. Gilman, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1995**, 34, 1406.
 - [5] J. L. Neumeyer, R. G. Booth, *Principals of Medicinal Chemistry*, 4th ed., Lea and Febiger, Philadelphia, **1995**.
 - [6] R. J. Whithley, A. W. Meikle, N. B. Watts, *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*, 2nd ed., Saunders, Philadelphia, **1994**.
 - [7] C. R. Craig, R. E. Stitzel, *Modern Pharmacology*, Little, Brown & Co, Boston, **1990**.
 - [8] W. Müller-Esterl, Vol. 2, Elsevier GmbH, München Spektrum akademischer Verlag, **2004**.
 - [9] Garland Publishing Inc, **1995**.
 - [10] <http://www.pdb.org/pdb/files/2glh.pdb>.
 - [11] Commons.wikimedia.org/wiki/File:Nuclear_Receptor_Structure.png?uselang=de
 - [12] L. Stryer, J. L. Tymoczko, J. M. Berg, Vol. 5. Auflage, Spektrum akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, **2003**.
 - [13] B. Thieke, *Makromolekulare Chemie*, 2. Aufl., Wiley-VCH GmbH & CO, Weinheim, **2005**.
 - [14] P. W. Atkins, Vol. 2. Auflage, VCH, Weinheim, **1996**.
 - [15] E. Gorter, F. Grendel, *J. Exp. Med.* **1925**, 41, 439.
 - [16] C. Tanford, Vol. 2, Wiley-Interscience, Chichester/New York, **1980**.
 - [17] R. C. McDonald, B. P. M. Minco, K. Takeshita, L. Hu, *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, 1061, 297.
 - [18] M. Ostro, *Sci. Am.* **1987**, 256, 102.
 - [19] R. Wick, M. Agelova, P. Walde, P. Luisi, *Chemistry&Biology* **1996**, 3, 105.
 - [20] K. Higashi, S. Suzuki, H. Fujii, Y. Kirino, *J. Biochem.* **1987**, 101, 433.
 - [21] G. Decher, H. Ringsdorf, J. Venzmer, D. Bitter-Suermann, C. Weisgerber, *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, 1023, 357.
 - [22] R. D. Kornberg, H. M. McConnell, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1971**, 68, 2564.
 - [23] E. Elson, *Gen. Physiol. Ser.* **1986**, 40, 367.
 - [24] A. Zachowski, P. F. Devaux, *Experientia* **1990**, 46, 644.
 - [25] R. R. C. New, IRL Oxford University Press, New York, **1990**.
 - [26] T. Parasassi, G. De Stasio, A. d'Ubaldo, E. Gratton, *Biophys. J.* **1990**, 57, 1179.
 - [27] T. Parasassi, G. De Stasio, G. Ravagnan, R. M. Rusch, E. Gratton, *Biophys. J.* **1991**, 60, 179.
 - [28] E. K. Krasnowska, E. Gratton, T. Parasassi, *Biophys. J.* **1998**, 74, 1984.
 - [29] D. Albrecht, *Journal de Physique* **1978**, 39, 301.
 - [30] H. Träuble, D. H. Haynes, *Chem. Phys. Lipids* **1971**, 7, 324.
 - [31] S. Tristram-Nagle, J. F. Nagle, *Chem. Phys. Lipids* **2004**, 127, 3.
 - [32] J. Sangster, *Wiley Series in Solutions Chemistry* **1997**, 2.
 - [33] Eugen Kellogg G, A. DJ, *Eur. J. Med. Chem.* **2000**, 35, 651.
 - [34] Albrecht, *Molekularbiologie der Zelle, Kapitel 10*, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, **1986**.
 - [35] G. Weber, F. J. Farris, *Biochemistry* **1979**, 18, 3075.
 - [36] T. Parasassi, E. Gratton, *J. Fluorescence* **1992**, 2, 167.
 - [37] T. Parasassi, M. D. Stefano, M. Loiero, G. Ravagnan, E. Gratton, *Biophys. J.* **1994**, 66, 120.
 - [38] T. Parasassi, A. M. Giusti, M. Raimondi, E. Gratton, *Biophys. J.* **1995**, 68, 1895.
 - [39] M. Levi, P. V. Wilson, O. T. Cooper, E. Gratton, *Photochem. Photobiol.* **1993**, 57, 420.
 - [40] M. Levi, P. V. Wilson, S. Nyugen, E. Iorio, O. Sapor, T. Parasassi, *Mechan. Ageing Developm.* **1997**, 97, 109.
 - [41] A. M. Campos, E. B. Abuin, E. A. Lissi, *Cool. Surf. A: Phys. Engin. Asp.* **1995**, 100, 155.
 - [42] D. Zubiri, A. Domecq, D. L. Bernik, *Coll. Surf. B: Biointerfaces* **1999**, 13, 13.
 - [43] R. Alleva, G. Ferretti, B. Borghi, E. Pignotti, A. Bassi, G. Curatola, *Transfus. Sci.* **1995**, 16, 291.
 - [44] S. Palleschi, L. Silvestroni, *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, 1279, 197.
 - [45] L. P. Zanello, E. Aztiria, S. Antollini, F. J. Barrantes, *Biophys. J.* **1996**, 70, 2155.
 - [46] J. C. Tapia, L. F. Aguilar, C. P. Sotomayor, L. G. Aguayo, *Europ. J. Pharmac* **1998**, 354, 239.
 - [47] Alberts, *Molekularbiologie der Zelle*, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, **2005**.
 - [48] S. J. Singer, G. L. Nicholson, *Science* **1972**, 175, 720.
 - [49] C. D. Frye, M. Edidin, *J. Cell. Sci.* **1970**, 7, 319.
-

- [50] W. W. Webb, *Annu. NY Acad. Sci.* **1981**, 336, 300.
- [51] T. B. Aldrich, *J. Amer. Chem. Soc.* **1905**, 27, 1074.
- [52] J. Berthet, T. W. Rall, E. W. Sutherland, *J. Biol. Chem.* **1957**, 224, 463.
- [53] T. W. Rall, E. W. Sutherland, W. D. Wosilait, *J. Biol. Chem.* **1956**, 218, 483.
- [54] E. W. Sutherland, W. D. Wosilait, *J. Biol. Chem.* **1956**, 218, 459.
- [55] W. D. Wosilait, E. W. Sutherland, *J. Biol. Chem.* **1956**, 218, 469.
- [56] A. D. Strosberg, *Protein Sci.* **1993**, 2, 1198.
- [57] T. M. Savarese, C. M. Fraser, *Biochem. J.* **1992**, 283 (Pt 1), 1.
- [58] M. R. Tota, M. R. Candelore, R. A. Dixon, C. D. Strader, *Trends Pharmacol. Sci.* **1991**, 12, 4.
- [59] K. Wieland, H. M. Zuurmond, C. Krasel, A. P. Ijzerman, M. J. Lohse, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, 93, 9276.
- [60] D. Nelson, M. Cox, *Lehninger Biochemie*, Vol. 3. Auflage, Springer, **2001**.
- [61] G. Krauss, *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*, Wiley, New York, **1999**.
- [62] S. J. Singer, *Science* **1992**, 255, 1671.
- [63] G. A. Woolley, *Acc. Chem. Res.* **2005**, 38, 486.
- [64] T. Loughheed, V. Borisenko, T. Hennig, K. Ruck-Braun, G. A. Woolley, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, 2, 2798.
- [65] M. Karle, D. Bockelmann, D. Schumann, C. Griesinger, U. Koert, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 4684.
- [66] B. L. Feringa, *Molecular Switches*, Wiley-VCH, Weinheim, **2001**.
- [67] A. P. de Silva, H. Q. Gunaratne, T. Gunnlaugsson, A. J. M. Huxley, C. P. McCoy, J. T. Rademacher, T. E. Rice, *Chem. Rev.* **1997**, 97, 1515.
- [68] J.-M. Lehn, *Supramol. Chem.*, VCH, Weinheim, **1995**.
- [69] J.-M. Lehn, *Chem. Rev.* **2000**, 100, 1683.
- [70] B. L. Feringa, *Acc. Chem. Res.* **2001**, 34, 504.
- [71] L. Zelikovich, J. Libman, A. Shanzer, *Nature* **1995**, 374, 790.
- [72] D. Kalny, M. Elhabiri, T. Moav, A. Vaskevich, I. Rubenstein, A. Shanzer, A.-M. Albrecht-Gary, *Chem. Comm.* **2002**, 1426.
- [73] H. Plenio, C. Aberle, *Chem. Eur. J.* **2001**, 7, 4438.
- [74] R. A. Bissel, E. Cordova, A.E. Kaifer, J.F. Stoddart, *Nature* **1994**, 369, 133.
- [75] P. R. Ashton, V. Balzani, J. Becher, A. Credi, M. C. T. Fyfe, G. Mattersteig, S. Menzer, M. B. Nielsen, F. M. Raymo, J. F. Stoddart, M. Venturi, D. J. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 3951.
- [76] M. Bauer, F. Vögtle, *Chem. Ber.* **1992**, 125, 1675.
- [77] S. Shinkai, *Molecular Switches*, Wiley-VCH, Weinheim, **2001**.
- [78] S. Shinkai, M. Ikeda, A. Sugasaki, M. Takeuchi, *Acc. Chem. Res.* **2001**, 34, 494.
- [79] D. S. Larsen, M. Vengris, I. H. M. van Stokkum, M. A. van der Horst, F. L. de Weerd, K. J. Hellingwerf, R. van Grondelle, *Biophys. J.* **2004**, 86, 2538.
- [80] M. A. van der Horst, K. J. Hellingwerf, *Acc. Chem. Res.* **2003**, 37, 13.
- [81] V. Borisenko, D. C. Burns, Z. Zhang, G. A. Woolley, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 6364.
- [82] M. Schütt, S. S. Krupka, A. G. Milbradt, S. Deindl, E.-K. Sinner, D. Oesterhelt, C. Renner, L. Moroder, *Chemistry & Biology* **2003**, 10, 487.
- [83] I. Willner, B. Willner, *Biological Applications of Photochemical Switches*, Vol. 2, Wiley-Interscience, New York, **1993**.
- [84] M. A. Mostoslavskii, V.A. Izmail'skii, *Russ. J. Gen. Chem.* **1961**, 31, 21.
- [85] M. A. Mostoslavskii, V.A. Izmail'skii, *Russ. J. Gen. Chem.* **1962**, 32, 1731.
- [86] M. A. Mostoslavskii, V.A. Izmail'skii, *Russ. J. Gen. Chem.* **1963**, 33, 727.
- [87] M. A. Mostoslavskii, V.A. Izmail'skii, *Russ. J. Gen. Chem.* **1965**, 35, 519.
- [88] T. Yamaguchi, T. Seki, T. Tamaki, K. Ichimura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1992**, 65, 649.
- [89] K. Eggers, T. M. Fyles, P. J. Montoya-Pelaez, *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 2966.
- [90] U. Koert, R. Krauss, H.-G. Weinig, C. Heumann, B. Ziemer, C. Mügge, M. Seydack, J. Bendig, *Chem. Eur. J.* **2001**, 575.
- [91] M. Raban, D. L. Burch, E. R. Hortelano, D. Durocher, D. Kost, *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 1283.
- [92] V. V. Samoshin, O. A. Zelenkina, I. V. Yartseva, N. S. Zefirov, *Zh. Org. Khim.* **1996**, 23, 2244.
- [93] V. V. Samoshin, V. A. Chertkov, L. P. Vaatlina, E. K. Dobretsova, N. S. Simonov, L. P. Katorsky, D. E. Gremyachinsky, H.-J. Schneider, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 3981.
- [94] G. W. Buchanan, K. Bourque, *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 3963.
- [95] H.-G. Weinig, R. Krauss, M. Seydack, J. Bendig, U. Koert, *Chem. Eur. J.* **2001**, 7, 2075.

- [96] R. Krauss, H.-G. Weinig, M. Seydack, J. Bendig, U. Koert, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 1905.
- [97] J. Berniger, R. Krauss, H.-G. Weinig, U. Koert, B. Ziemer, K. Harms, *Chem. Eur. J.* **1999**, 875.
- [98] R. Krauss, U. Koert, *Synlett* **2003**, 598.
- [99] H. Yuasa, H. Hashimoto, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121.
- [100] S. E. O'Connor, B. Imperiali *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 2296.
- [101] H. J. Schneider, F. Werner, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1992**, 490.
- [102] V. A. Palyulin, S.V. Emets, V.A. Chertkov, C. Kasper, H.J. Schneider, *Chem. Eur. J.* **1999**, 3479.
- [103] J. N. H. Reek, H. Engelkamp, A.E. Rowan, J. A. A. W. Elemans, R. J. M. Nolte, *Chem. Eur. J.* **1998**, 4, 716.
- [104] P. Talukdar, G. Bollot, J. Mareda, N. Sakai, S. Matile, *Chem. Eur. J.* **2005**, 11, 6525.
- [105] Y. J. Jeon, H. Kim, S. Jon, N. Selvapalam, D. H. Oh, I. Seo, C.-S. Park, S. R. Jung, D.-S. Koh, K. Kim, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 15944.
- [106] I. Tabushi, Y. Kuroda, K. Yokota, *Tetrahedron Lett.* **1982**, 23, 4601.
- [107] B. Baumeister, N. Sakai, S. Matile, *Org. Lett.* **2001**, 3, 4229.
- [108] G. Das, P. Talakdur, S. Matile, *Science* **2002**, 298, 1600.
- [109] T. M. Fyles, D. Loock, X. Zhou, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 2997.
- [110] V. Gorteau, F. Perret, G. Bollot, J. Mareda, A. N. Lazar, A. W. Coleman, D.-H. Tran, N. Sakai, S. Matile, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 13592.
- [111] S. Matile, *Chem. Soc. Rev.* **2001**, 30, 158.
- [112] N. Sakai, B. Baumeister, S. Matile, *ChemBioChem* **2000**, 1, 123.
- [113] N. Sakai, J. Mareda, S. Matile, *Acc. Chem. Res.* **2005**, 38, 79.
- [114] N. Sakai, S. Matile, *Chem. Comm.* **2003**, 2514.
- [115] Y. Tanaka, Y. Kobuke, M. Sokabe, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 717.
- [116] R. S. Hector, M. S. Gin, *Supramol. Chem.* **2005**, 17, 129.
- [117] S. Matile, A. Som, N. Sorde, *Tetrahedron* **2004**, 60, 6405.
- [118] R. S. Lokey, B. L. Iverson, *Nature* **1995**, 375, 303.
- [119] G. J. Gabriel, B. L. Iverson, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 15174.
- [120] J. Lee, V. Guelev, S. Sorey, D.W. Hoffman, B. L. Iverson, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 14036.
- [121] S. A. Vignon, T. Jarrosson, T. Iijima, H.-R. Tseng, J. M. K. Sanders, J. F. Stoddart, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 9884.
- [122] T. Iijima, S. A. Vignon, H. R. Tseng, T. Jarrosson, J. M. K. Sanders, F. Marchioni, M. Venturi, E. Apostoli, V. Balzani, J. F. Stoddart, *Chem. Eur. J.* **2004**, 10, 6375.
- [123] D. G. Hamilton, N. Feeder, S. J. Teat, J. M. K. Sanders *New. J. Chem.* **1998**, 22, 1019.
- [124] R. L. Furlan, S. Otto, J. M. K. Sanders, *Proc. natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 4801.
- [125] G. D. Fallon, M. A.-P. Lee, S. J. Langford, P. J. Nichols, *Org. Lett.* **2004**, 6, 655.
- [126] K. Kim, H.-J. Kim, *Encyclopedia of Supramolecular Chemistry*, New York, **2004**.
- [127] W. L. Mock, *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, Vol. Vol.2, Pergamon, Oxford, **1996**.
- [128] K. Kim, H.-J. Kim, *Chem. Soc. Rev.* **2002**, 31, 96.
- [129] N. S. Jon, D. H. Oh, J.-K. Kang, S.-Y. Kim, Y. J. Jeon, J. W. Lee, K. Kim *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 10186.
- [130] K. Kano, J. H. Fendler, *Biochim. Biophys. Acta* **1978**, 509, 209.
- [131] J. H.-J. K. Zhao, J. Oh, S.-Y. Kim, J. W. Lee, S. Sakamoto, K. Yamaguchi, K. Kim *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 4233.
- [132] K. Williams, *Biochem. J.* **1997**, 325, 289.
- [133] X. X. Zhang, K. E. Krakowiak, G. Xue, J. S. Bradshaw, R. M. Izatt, *Ind. Eng. Chem. Res.* **2000**, 39, 3516.
- [134] G. Eisenman, R. J. Horn, *J. Membr. Biol.* **1983**, 76, 197.
- [135] T. Laio, V. Torre, *Biophys. J.* **1999**, 76, 129.
- [136] M. M. Tedesco, B. Ghebremariam, N. Sakai, S. Matile, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 540.
- [137] T. K. Rostovtseva, V. M. Aguilera, I. Vodyanoy, S.M. Bezrukov, V.A. Parsegian, *Biophys. J.* **1998**, 75, 1783.
- [138] J.-I. Kikuchi, K. Ariga, Y. Sasaki, K. Ikeda, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2001**, 11, 977.
- [139] J.-I. Kikuchi, K. Ariga, T. Miyazaki, K. Ikeda, *Chem. Lett.* **1999**, 253.
- [140] J.-I. Kikuchi, K. Ariga, K. Ikeda, *Chem. Commun. (Cambridge)* **1999**, 547.
- [141] J.-I. Kikuchi, *Mol. Recognit. Inclusion, Proc. Int. Symp., 9th* **1998**, 129.
- [142] Y. Murakami, J. Kikuchi, *Bioorg. Chem. Frontiers* **1991**, 2, 73.
-

- [143] P. Barton, C. A. Hunter, T. J. Potter, S. J. Webb, N. H. Williams, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, 41, 3878.
- [144] C.-H. Heldin, J. Ericsson, *Science* **2001**, 294, 2111.
- [145] H. P. Dijkstra, J. J. Hutchinson, C. A. Hunter, H. Qin, S. Tomas, S. J. Webb, N. H. Williams, *Chem. Eur. J.* **2007**, 13, 7215.
- [146] C. A. Hunter, Emma L. Doyle, Helen C. Phillips, Simon J. Webb, Nicholas H. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 4593.
- [147] R. Mesibov, G. W. Ordal, J. Adler, *J. Gen. Physiol.* **1973**, 62, 203.
- [148] R. Jasuja, J. Keyoung, G. P. Reid, D. R. Trentham, S. Khan, *Biophys. J.* **1998**, 76, 1706.
- [149] L. D. Bray, C. J. Morton-Firth, *Nature* **1998**, 393, 85.
- [150] M. N. Levit, J. B. Stock, *B. Mol. Microbiol.* **1998**, 30, 459.
- [151] T. A. J. Duke, *D. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, 96, 10104.
- [152] J. E. Gestwickl, L.L. Kiesling, *Chem. Biol.* **2000**, 7, 583.
- [153] A. G. Cochran, *Science* **1996**, 271, 1113.
- [154] M. Mammen, G. M. Whitesides, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1998**, 37, 2754.
- [155] T. Schrader, *Angew. Chem.* **1996**, 108, 2816.
- [156] G. T. Morin, M.-F. Paugam, M. P. Hughes, B. D. Smith, *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 2724.
- [157] J. T. Bien, M. Shang, B. D. Smith, *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 2147.
- [158] T. D. James, K. R. A. Sandanayake Samankumara, S. Shinkai, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1996**, 35, 1911.
- [159] B. D. Smith, *Supramol. Chem.* **1996**, 7, 55.
- [160] B. D. Smith, *ACS Symp. Ser.* **1996**, 642, 194.
- [161] P. R. Westmark, S. J. Gardiner, B. D. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 11093.
- [162] L. A. Cabell, M.-K. Monahan, E. V. Anslyn, *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 7753.
- [163] S. Arimori, L. I. Bosch, C. J. Ward, T. D. James, *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 4553.
- [164] S. P. Draffin, P. J. Duggan, S. A. Duggan, *Org. Lett.* **2001**, 3, 917.
- [165] W. Yang, J. Yan, H. Fang, B. Wang, *Chem. Commun.* **2003**, 792.
- [166] L. I. Bosch, T. M. Fyles, T. D. James, *Tetrahedron* **2004**, 60, 11175.
- [167] S. Hayik, K. L. Bhat, C. W. Bock, *Struct. Chem.* **2004**, 15, 133.
- [168] R. Mulla Hormuzd, J. Agard Nicholas, A. Basu, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 25.
- [169] P. Nicholls Malcolm, K. C. Paul Prem, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, 2, 1434.
- [170] B. D. Smith, J. P. Davis, S. P. Draffin, P. J. Duggan, *Supramol. Chem.* **2004**, 16, 87.
- [171] J. Yan, G. Springsteen, S. Deeter, B. Wang, *Tetrahedron* **2004**, 60, 11205.
- [172] J. Zhao, T. M. Fyles, T. D. James, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, 43, 43.
- [173] M. Ellermann, Diplomarbeit, Philipps-Universität (Marburg), **2005**.
- [174] M. Maue, Doktorarbeit, Philipps-Universität (Marburg), **2005**.
- [175] M. Maue, K. Bernitzki, M. Ellermann, T. Schrader, *Synthesis* **2008**, 2247.
- [176] T. Schrader, M. Maue, M. Ellermann, *J. Recept. Signal Transduction* **2006**, 26, 473.
- [177] M. Maue, T. Schrader, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, 44, 2265.
- [178] T. Schrader, M. Herm, *Mater. Sci. Eng., C* **2001**, C18, 147.
- [179] M. Herm, O. Molt, T. Schrader, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, 40, 3148.
- [180] T. Schrader, *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 264.
- [181] O. Molt, D. Ruebeling, T. Schrader, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 12086.
- [182] M. Herm, T. Schrader, *Chemistry* **2000**, 6, 47.
- [183] G. T. Morin, M. F. Paugam, M. P. Hughes, B. D. Smith, *Chem. Eur. J.* **1994**, 59, 2724.
- [184] J. T. Bien, M. Y. Shang, B. D. Smith, *Chem. Eur. J.* **1995**, 60, 2147.
- [185] T. D. James, K. Sandanayake, S. Shinkai, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1996**, 35, 1911.
- [186] J. Psotova, O. Janiczek, *Chemické Listy* **1995**, 89, 641.
- [187] H. Shinmori, M. Takeuchi, S. Shinkai, *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2* **1996**, 1.
- [188] B. D. Smith, in *Chemical Separations with Liquid Membranes*, Vol. 642, **1996**, pp. 194.
- [189] B. D. Smith, J. P. Davis, S. P. Draffin, P. J. Duggan, *Supramol. Chem.* **2004**, 16, 87.
- [190] P. R. Westmark, S. J. Gardiner, B. D. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 11093.
- [191] L. A. Cabell, M. K. Monahan, E. V. Anslyn, *Tetrahedron Letters* **1999**, 40, 7753.
- [192] M. Di Luccio, B. D. Smith, T. Kida, C. P. Borges, T. L. M. Alves, *Journal of Membrane Science* **2000**, 174, 217.

- [193] H. Kobayashi, K. Nakashima, E. Ohshima, Y. Hisaeda, I. Hamachi, S. Shinkai, *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2* **2000**, 5, 997.
- [194] K. Koumoto, S. Shinkai, *Chem. Lett.* **2000**, 856.
- [195] S. P. Draffin, P. J. Duggan, S. A. M. Duggan, *Org. Lett.* **2001**, 3, 917.
- [196] T. D. James, S. Shinkai, in *Host-Guest Chemistry*, Vol. 218, **2002**, pp. 159.
- [197] S. Striegler, *Curr. Org. Chem.* **2003**, 7, 81.
- [198] L. I. Bosch, M. F. Mahon, T. D. James, *Tetrahedron Letters* **2004**, 45, 2859.
- [199] H. S. Cao, M. D. Heagy, *J. of Fluorescence* **2004**, 14, 569.
- [200] P. J. Duggan, *Austral. Journal of Chemistry* **2004**, 57, 291.
- [201] S. Hayik, K. L. Bhat, C. W. Bock, *Structural Chemistry* **2004**, 15, 133.
- [202] H. R. Mulla, N. J. Agard, A. Basu, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2004**, 14, 25.
- [203] M. P. Nicholls, P. K. C. Paul, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2004**, 2, 1434.
- [204] M. Pietraszkiewicz, P. Prus, O. Pietraszkiewicz, *Tetrahedron* **2004**, 60, 10747.
- [205] J. Yan, G. Springsteen, S. Deeter, B. H. Wang, *Tetrahedron* **2004**, 60, 11205.
- [206] J. Z. Zhao, T. M. Fyles, T. D. James, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, 43, 3461.
- [207] W. Q. Yang, J. Yan, H. Fang, B. H. Wang, *Chem. Comm.* **2003**, 792.
- [208] W. Q. Yang, L. Lin, B. H. Wang, *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 7981.
- [209] J. F. Wang, S. Jin, B. H. Wang, *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 7003.
- [210] S. Boduroglu, J. M. El Khoury, D. V. Reddy, P. L. Rinaldi, J. Hu, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2005**, 15, 3974.
- [211] J. Kikuchi, K. Ariga, K. Ikeda, *Chem. Comm.* **1999**, 547.
- [212] J. Kikuchi, K. Ariga, Y. Sasaki, K. Ikeda, *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **2001**, 11, 977.
- [213] A. B. Smith, III, S. N. Savinov, U. V. Manjappara, I. M. Chaiken, *Org. Lett.* **2002**, 4, 4041.
- [214] R. Schmidt, D. Geissler, V. Hagen, J. Bendig, *J. Phys. Chem. A* **2007**, 111, 5768.
- [215] M. Ellermann, Diplomarbeit, Philipps-Universität (Marburg), **2005**.
- [216] M. Herm, T. Schrader, *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.* **1999**, 144-146, 749.
- [217] A. U. Acuna, F. Amat-Guerri, E. Quesada, M. Velez, *Biophys. Chem.* **2006**, 122, 27.
- [218] M. D. Mowery, C. E. Evans, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 11.
- [219] N. A. Porter, D. R. Magnin, B. T. Wright, *Prepr. - Am. Chem. Soc., Div. Pet. Chem.* **1986**, 31, 875.
- [220] J. Tsibouklis, C. Pearson, Y. P. Song, J. Warren, M. Petty, J. Yarwood, M. C. Petty, W. J. Feast, *J. Mater. Chem.* **1993**, 3, 97.
- [221] A. S. Hay, *J. Org. Chem.* **1962**, 27, 3320.
- [222] P. G. Wuts, T. W. Greene, *Protective Groups in organic Chemistry*, Wiley, **1991**.
- [223] J. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Vol. 2. Aufl., Springer Verlag, Berlin, **1999**.
- [224] A. Sharma, S. G. Schulman, *Einführung in die Fluoreszenzspektroskopie*, Wiley Interscience, New York, **1999**.
- [225] T. Förster, *Ann. Physik* **1948**, 437, 55.
- [226] L. Stryer, *Annu. Rev. Biochem.* **1978**, 819.
- [227] R. M. Clegg, *Reviews in Fluorescence* **2006**, 1.
- [228] <http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:FRET-Spektren%C3%BCberlappung.png&filetimestamp=20100218213406>.
- [229] <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:FRET-Abstand.png?uselang=de#filelinks>.
- [230] <http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:FRET-Orientierung.png&filetimestamp=20100327203707>.
- [231] S. Thomas, A. P. Pais, S. Casares, T. D. Brumeanu, *Molecular Immunology* **2004**, 41, 399.
- [232] Z. Korade, *Neuropharmacology* **2008**, 55, 1265.
- [233] L. J. Pike, *Journal of Lipid Research* **2008**, 1.
- [234] A. Rietveld, K. Simons, *Biochim. Acta* **1998**, 1376, 467.
- [235] S. Wang, E. Martin, J. Cimino, G. Omann, M. Glaser, *Biochemistry* **1988**, 27, 2033.
- [236] F. Sasha, Diplomarbeit, Universität Dortmund, **1999**.
- [237] P. R. Cullis, P. W. M. Van Dijk, B. De Kruijff, J. De Gier, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **1978**, 513, 21.
- [238] S. Karmakar, V. A. Raghunathan, *Phys. Rev. Lett.* **2003**, 91.
- [239] L. Bartsch, Bachelorarbeit, Universität Duisburg-Essen **2008**.
- [240] S. Yamashita, Nishimoto, E., Szabo, A., Yamasaki, N., *Biochemistry* **1996**, 35, 531.
- [241] <http://www.olympusfluoview.com/applications/fretintro.html>.
- [242] M. Micki, C. G. dos Remedios, *Biochem. Int.* **1990**, 22, 125.

- [243] K. E. B. Sapsford, F. Lorenzo; M. Medintz, L. Igor, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 4676.
 - [244] H. M. Watrob, C. P. Can, M. D. Barkley, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 7336.
 - [245] A. K. Tong, S. Jockusch, Z.M. Li, H.R. Zhu, D.L. Akins, N.J. Turro, J.Y. Ju, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 12923.
 - [246] A. N. Glazer, *J. Appl. Phycol.* **1994**, 6, 105.
 - [247] A. N. Glazer, *Methods Enzymol.* **1988**, 49, 291.
 - [248] A. N. Glazer, J. H. Clark, *Biophys. J.* **1986**, 49, 115.
 - [249] G. F. Schröder, H. Grubmüller, *Comp. Phys. Commun.* **2004**, 158, 150.
 - [250] V. Balzani, P. Ceroni, S. Gestermann, M. Gorka, C. Kauffmann, M. Maestri, F. Vogtle, *ChemPhysChem* **2000**, 1, 224.
 - [251] N. Sakai, S. Matile, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 14348.
 - [252] F. Perret, M. Nishihara, T. Takeuchi, S. Futaki, A. N. Lazar, A. W. Coleman, N. Sakai, S. Matile, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 1114.
 - [253] B. K.-K. Fung, L. Stryer, *Biochemistry* **1978**, 17, 5241.
 - [254] P. K. Wolber, B. S. Hudson, *Biophys. J.* **179**, 28, 197.
 - [255] A. Dasgupta, (Essen), **2010**.
 - [256] Y. Kanaoka, M. Machida, K. Ando, T. Sekine, *Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct.* **1970**, 207, 269.
 - [257] A. F. Boyne, G. L. Ellman, *Anal. Biochem.* **1972**, 46, 639.
 - [258] *Organikum, Vol. 21., neu bearbeitete und erweiterte Auflage*, Wiley-VCH, **2001**.
-

